



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

Résumés non techniques des projets autorisés (60)

6001. Le virus respiratoire syncytial humain est responsable d'infections graves, en particulier chez les nourrissons. Il n'existe à l'heure actuelle aucune prophylaxie contre ce virus et les traitements disponibles sont peu efficaces et très chers. Il convient donc de réaliser des recherches pour identifier des nouveaux traitements antiviraux.

Le but de ce projet est de tester les propriétés antivirales de la molécule Sephin 1, récemment identifiée comme un inhibiteur spécifique de GADD34, une protéine de l'hôte. Des expériences récentes réalisées au laboratoire montrent que la Sephin 1 inhibe la réplication du virus respiratoire syncytial humain en culture cellulaire et nous souhaitons donc maintenant évaluer son pouvoir antiviral *in vivo* dans un modèle animal.

Nous allons tester l'effet antiviral de la molécule Sephin 1 contre deux virus et nous allons utiliser deux lots de 97 souris, soit au total 194 souris.

Le nombre d'animaux utilisés est au plus bas, suivant la règle des 3R, tout en s'assurant que nous aurons suffisamment de répliques pour que nos données soient valables statistiquement. Des analyses en culture cellulaire ont été réalisées au préalable afin de ne recourir aux infections expérimentales uniquement lorsque cela est strictement nécessaire pour le projet.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des souris) sans restriction ;
- Manipulation des souris sous une hotte prévue à cet effet par du personnel qualifié ;
- Enrichissement de l'environnement par des cachettes pour souris en carton.
- Mise en place d'un suivi clinique quotidien par le vétérinaire responsable de l'essai.

6002. L'assistance circulatoire mécanique (ACM) est utilisée chez les patients avec une insuffisance cardiaque grave en attente d'une greffe cardiaque ou ayant une contre-indication à la greffe. Elle consiste en l'implantation d'une pompe artificielle afin de suppléer la défaillance cardiaque. L'ACM repose actuellement sur des pompes à débit continu qui soumettent le sang à des forces non physiologiques causant des altérations du facteur von Willebrand (VWF), protéine jouant un rôle essentiel dans la coagulation. Ceci se traduit par de fréquents et graves saignements sous ACM. Les pompes d'ACM à débit continu induisent aussi une perte variable de la pulsatilité artérielle physiologique, paramètre également associé à la gravité des saignements sous ACM. Le développement de nouveaux dispositifs d'ACM permettant d'éviter les troubles de la coagulation est ainsi essentiel pour assurer une meilleure prise en charge des patients en insuffisance cardiaque.

Le but de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'impact de la pulsatilité artérielle sur les anomalies fonctionnelles du VWF, à l'aide d'un prototype d'ACM à pulsatilité variable. Notre hypothèse est que le maintien d'un niveau élevé de pulsatilité artérielle permettrait de diminuer les altérations du VWF sous ACM.

Dans le respect de l'éthique, notre projet respecte la règle des 3R. En effet, une étude *in vitro* a été préalablement réalisée sur cette ACM à pulsatilité variable, nous apportant des données sur la dégradation du VWF en l'absence de pulsatilité artérielle. Cependant, elle ne peut remplacer une étude *in vivo* chez l'animal, étape nécessaire afin de tenir compte de l'effet de la pulsatilité artérielle sur l'ensemble de l'arbre vasculaire.

Notre étude sera réalisée chez le mouton, espèce adaptée pour l'évaluation des ACM (anatomie proche de l'homme, débit cardiaque suffisant, exploration du VWF compatible). 27 moutons de race « Préalpes du Sud » d'environ 70 kg seront utilisés. Chaque animal sera son propre témoin permettant de réduire le nombre d'animaux à inclure dans l'étude.

Les méthodes de raffinement nous permettant de limiter la douleur et le stress des animaux consisteront en une anesthésie, une antibioprophylaxie, une analgésie et une surveillance clinique et biologique pendant toute la durée de la procédure. Dans un premier modèle sans réveil, nous évaluerons les variations fonctionnelles en fonction du niveau de pulsatilité artérielle, grâce à l'implantation chirurgicale d'une ACM à pulsatilité variable. Dans un deuxième modèle avec réveil et surveillance durant 7 jours, nous évaluerons les performances hémodynamiques et l'hémocompatibilité de prototype innovant d'ACM.

Si les résultats obtenus dans ces deux modèles animaux sont concluants, nous pourrions alors passer à l'étude clinique chez l'homme.

6003. Le récepteur aux produits de glycation avancés (RAGE pour Receptor for advanced glycation end products) est un récepteur de surface exprimé par de nombreux types cellulaires et pouvant lier de nombreux ligands. A ce titre, il est considéré comme appartenant à la famille des récepteurs de l'immunité innée. Plusieurs études ont montré sa régulation au cours de pathologies

inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le diabète et récemment au cours des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Ce projet vise à étudier le rôle du récepteur RAGE dans un contexte physiopathologique complexe et le modèle animal ne pourra être remplacé. L'objectif est de déterminer, dans des modèles murins mimant les MICI, l'implication du RAGE dans le développement d'une inflammation intestinale ainsi que l'utilisation thérapeutique d'inhibiteurs du RAGE dans la prévention de cette inflammation. Dans un premier temps, une colite ou une entérite chimique sera induite chez des souris de fond génétique C57bl6 invalidées ou non pour le récepteur RAGE. Les effets en termes de développement d'une inflammation intestinale seront alors évalués. Dans un second temps, une intervention thérapeutique utilisant des inhibiteurs du RAGE sera mise en place chez des souris de fond génétique C57bl6 chez lesquelles une colite ou une entérite aura été induite.

En fonction des résultats expérimentaux obtenus au cours du projet et de la réplication des résultats positifs, un maximum de 3456 souris sera utilisé.

Des expériences préliminaires sur modèle murin ont permis de valider la surexpression du récepteur RAGE au cours des modèles de colite et d'entérite prévus dans ce projet et donc la pertinence de l'étude.

Dans un processus de réduction d'animaux en expérimentation, nous avons inclus dans le protocole le minimum d'animaux permettant de garder une puissance statistique suffisante dans le traitement des résultats.

Pendant toute la durée du protocole, les animaux seront suivis quotidiennement afin d'identifier des signes éventuels de souffrance (prostration, vocalisation, tremblement). Un suivi du poids des animaux sera réalisé quotidiennement au cours du protocole d'inflammation et une perte de poids supérieure à 20% sera considérée comme point limite et entraînera l'euthanasie de l'animal concerné. Les souris seront hébergées par groupes de 6 animaux par cage. Elles seront manipulées par du personnel formé et expérimenté afin de réduire leur stress pendant l'expérimentation.

6004. L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est une dilatation anormale de l'aorte, le plus gros vaisseau de l'organisme. Il s'agit d'une maladie fréquente puisque 4 à 8% des hommes de plus de 60 ans sont atteints. Le risque principal est la rupture, se traduisant par une hémorragie interne, mortelle dans 80% des cas. L'insuffisance rénale chronique (IRC) correspond à une incapacité des reins à assurer l'épuration des déchets circulants dans l'organisme. L'IRC a un rôle controversé sur le développement des AAAs. Pour certains experts, il s'agirait d'un facteur protecteur car l'IRC est source de calcifications solidifiant la paroi de l'aorte et résistant donc à la dilatation. A l'inverse, certaines études récentes retrouvaient l'IRC comme facteur de risque d'AAA, du fait de la présence de facteurs inflammatoires favorisant la croissance des AAA. Le but de cette étude est donc d'établir les liens éventuels entre l'IRC et l'AAA sur la base de modèles expérimentaux. Pour ce faire, nous utiliserons des modèles validés et bien connus d'AAA et d'IRC chez le rat. Toutes les interventions chirurgicales seront réalisées après prémédication puis sous anesthésie générale afin de limiter la douleur de l'animal. Notre projet respecte la règle des 3R. Aucune méthode alternative fiable (pas de modèle *in vitro*) n'existe pour créer un AAA. Seuls les modèles expérimentaux d'AAA, largement reconnus, bien établis et proches de la physiopathologie humaine, peuvent être utilisés pour espérer une transposition des résultats chez l'homme. Sur la base d'études statistiques, 360 rats Wistar âgés de 6 semaines seront répartis en quatre groupes: un groupe témoin (T), un groupe calcifié seul (CS), un groupe urémique seul (US) et un groupe urémique et calcifié (UC). Dans les groupes, US et UC, l'IRC sera créé via le modèle largement décrit d'ablation des 5/6<sup>ème</sup> de la masse rénale. Les rats du groupe UC seront soumis en plus à un régime pro-calcifiant riche en calcium afin de favoriser les calcifications artérielles. Les rats du groupe CS seront également soumis au même régime pro-calcifiant. Dans le groupe T, les rats auront une intervention témoin sans ablation de masse rénale et sans régime. Lorsque les rats auront atteint l'âge de 8 semaines, les AAA seront créés dans les quatre groupes par le modèle d'infusion intra-aortique d'élastase. Une analgésie avec de la buprénorphine (0,05 mg/Kg) sera réalisée en pré- et post-opératoire afin de limiter la douleur pour chaque procédure.

Les animaux seront maintenus sans isolement, les cages seront équipées d'enrichissement afin d'éviter tout stress supplémentaire et l'entretien des animaux sera fait par des personnes compétentes et expérimentées. Trois semaines plus tard, les rats seront mis à mort et les quatre groupes seront comparés selon des critères liés au degré d'IRC, aux calcifications et aux diamètres des AAA. En perspective, ce projet pourrait permettre de moduler la croissance des AAA expérimentaux via l'induction de calcifications ou l'injections de molécules présentes en cas d'IRC. Ceci pourrait permettre la transposition de ces résultats chez l'homme dans le futur.

6005. La consommation excessive d'alcool est la première cause de cirrhose en France. L'atteinte du foie (atteinte hépatique) débute par une accumulation de gouttelettes lipidiques (triglycérides) dans les cellules du foie appelée stéatose. Durant l'abus d'alcool, cette stéatose peut évoluer vers une inflammation du foie appelée hépatite alcoolique. La maladie peut ensuite évoluer vers la fibrose (stade auquel les cellules du foie ne se régénèrent plus et où un tissu cicatriciel apparaît) puis la cirrhose et jusqu'au cancer du foie. La mortalité des formes sévères de l'hépatite alcoolique est comprise entre 50 et 75%. La corticothérapie est le seul traitement qui peut améliorer le pronostic à court terme. Ainsi, parmi les sujets ayant une forte consommation d'alcool à long terme, la majorité des patients développent une stéatose, mais seulement 10 à 35% développeront une hépatite alcoolique et 8 à 20% évolueront vers la cirrhose. D'autres facteurs que la seule consommation excessive d'alcool interviennent dans la genèse des lésions hépatiques. La recherche de facteurs qui relient consommation d'alcool, nature et progression des lésions hépatiques est donc essentielle pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques améliorant la prise en charge de ces formes graves. Il a récemment été démontré que le microbiote intestinal (bactéries présentes dans notre tube digestif) participe à la survenue des lésions hépatiques au cours de l'alcoolisation.

En effet, des souris ayant reçu un microbiote de patients ayant une consommation chronique et excessive d'alcool et ne développant pas de lésions hépatiques (noAH) ne développent pas non plus de lésions hépatiques suite à une alcoolisation. Inversement, des

souris ayant reçu un microbiote de patients ayant une hépatite alcoolique sévère (sAH) développent des lésions hépatiques suite à une alcoolisation. Ces protocoles de transferts de microbiote humain permettent d'humaniser des souris et ont ainsi été validés.

L'objectif de ce projet est d'identifier des bactéries protectrices qui pourraient prévenir l'aggravation des lésions hépatiques au cours de la maladie alcoolique du foie. Pour cela, nous allons dans un premier temps identifier des bactéries d'intérêts puis nous testeront leur potentiel protecteur dans un modèle murin de maladie alcoolique du foie.

Nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement) au cours de nos différentes procédures. Les complications hépatiques observées au cours de la maladie alcoolique du foie mettent en jeu des interactions entre les différents organes qu'il est actuellement impossible de reproduire *in vitro*. Il nous faut étudier l'effet de l'alimentation en particulier l'alcool sur les bactéries intestinales, l'effet de ces bactéries sur la barrière intestinale et au final l'impact de cette atteinte sur le développement des lésions du foie. Le seul modèle auquel nous pouvons avoir recours est l'animal (Remplacement). Le rongeur, ici la souris, partage bon nombre de processus cellulaires avec l'Homme et un modèle d'alcoolisation largement décrit dans la littérature existe chez la souris et est couramment utilisé par notre équipe.

Au total ce projet nécessite l'utilisation de 500 souris, nombre d'animaux qui est réduit au minimum, mais suffisant pour pouvoir faire des comparaisons et des statistiques exploitables. Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour l'animal en souffrance en particulier concernant le taux d'alcoolisation. Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien-être animal. Cependant l'enrichissement classiquement utilisé étant en cellulose et ayant un impact sur le microbiote intestinal, nous avons investi dans des enrichissements en plastique dur et la quantité de sciure dans la cage est augmentée afin de permettre aux animaux un enfouissement suffisant.

6006. Le but de ce travail est d'étudier l'ampleur de la participation de modulateurs du système nerveux sur la transmission douloureuse et ses modifications en conditions de douleurs chroniques. Le glutamate et le GABA sont des neurotransmetteurs ubiquitaires du système nerveux central qui contrôlent notamment les transmissions des informations douloureuses dans la corne dorsale de la moelle épinière. Ces neurotransmetteurs peuvent également agir sur des modulateurs qui ont des effets durables sur la transmission nociceptive. La présente saisine nous permettra d'étudier le rôle de l'activation de deux types de modulateurs, les récepteurs métabotropiques du glutamate et du GABA sur l'activation des canaux ioniques perméables au calcium (canaux responsables d'une augmentation de la réponse douloureuse) et la transmission douloureuse. On se propose d'étudier également le rôle des récepteurs métabotropiques du glutamate et du GABA chez des modèles animaux neuropathiques. Pour cela, nous utiliserons un dérivé du modèle qui consiste en une ligature serrée de la racine L5 du nerf sciatique.

L'objectif sera d'identifier des cibles thérapeutiques possibles permettant d'envisager des traitements nouveaux dans la lutte contre les douleurs chroniques consécutives à des neuropathies périphériques.

Afin de limiter le nombre d'animaux et de répondre à la règle des 3R, les résultats obtenus nous permettront de développer un modèle informatique sous le logiciel neuron afin de tester les conséquences potentielles de l'application de nos substances pharmacologiques sur la transmission douloureuse (Remplacer). Ces expériences seront réalisées sur des rats mâles Spragues Dawley dont le nombre total est de  $n = 420$ . Nous ferons le maximum afin de limiter les groupes expérimentaux à un minimum acceptable statistiquement. Chaque condition expérimentale testée concerne un lot de 10 animaux pour une interprétation statistique des résultats (Réduire). De la même façon, nous adapterons les protocoles afin de supprimer la souffrance des animaux (Raffinement : suivi des animaux avec Fiche Scorée).

6007. Les effets tissulaires de l'ischémie reperfusion (I/R, situation dans laquelle la circulation sanguine d'un tissu est provisoirement interrompue avec privation d'oxygène, puis remise en route avec réoxygénation tissulaire), dans le cadre de transplantation d'organe, sont bien connus chez l'homme, en particulier sur le greffon rénal. Les bénéfices de la conservation des greffons rénaux par des dispositifs *ex vivo*, ainsi que les effets tissulaires de ces bénéfices, ont été largement étudiés.

Les lambeaux libres utilisés chez l'homme dans le cadre de reconstructions post-traumatiques ou après chirurgie d'exérèse cancéreuse pourraient également être conservés *ex vivo*, en particulier pour augmenter la durée d'ischémie froide en cas de problème opératoire intercurrent, ou encore lors de chirurgie de reprise en urgence du lambeau (ischémie chaude) pour notamment réoxygéner le lambeau ayant subi une privation d'oxygène trop longue.

Un dispositif de conservation/perfusion du lambeau serait très utile en chirurgie plastique dans ces cas de reconstructions microchirurgicales avec anastomoses vasculaires, mais ce dispositif n'existe pas à l'heure actuelle. Peu d'études préliminaires se sont intéressées à la conservation des lambeaux en ischémie froide, et aucune étude n'a encore permis de juger de l'efficacité du sauvetage d'un lambeau en ischémie chaude (comme en cas d'échec d'une reconstruction microchirurgicale chez l'homme) par un dispositif *ex vivo*.

Le projet a pour objectifs :

- mettre au point sur l'animal avant de le transposer chez l'homme, un dispositif de conservation ou de sauvetage des lambeaux musculaires, en utilisant une machine type perfuseur de greffon rénal et en perfusant le lambeau avec un liquide biologique, avant de greffer ces lambeaux
- d'évaluer l'ischémie/reperfusion sur ces lambeaux, chez l'animal, en l'occurrence le porc.

Le porc est l'animal de choix, car son anatomie vasculaire présente de grandes similarités (diamètre des vaisseaux notamment) avec celle de l'homme et cela en fait un modèle unique pour les études de transplantation chez l'être humain.

Dans notre étude il est nécessaire de prélever les lambeaux sur des animaux vivants afin de garder les mêmes caractéristiques que les lambeaux chez l'homme lors des reconstructions microchirurgicales. En effet, la circulation sanguine joue un rôle majeur sur le lambeau et même quelques minutes d'arrêt circulatoire sont connues pour engendrer des lésions particulières immédiates qui

risqueraient de fausser les résultats et de compromettre l'éventuelle utilisation des dispositifs de perfusion étudiés dans ce protocole. L'obtention de résultats significatifs nécessite le prélèvement de 66 lambeaux au total. Afin de réduire le nombre d'animaux, les lambeaux seront prélevés de façon bilatérale (prélèvement de deux muscles grand dorsal par animal) donc un effectif de 33 animaux a été calculé. Tous les prélèvements seront réalisés sous anesthésie générale et analgésie, sous monitoring continu. En fin de procédure, afin d'éviter toute souffrance les animaux étant sous anesthésie générale profonde recevront une dose létale d'euthanasiant.

6008. Le cancer de la vessie se situe au 7<sup>ème</sup> rang des cancers les plus fréquents en France. Depuis plus de 10 ans, des thérapies ciblant des anomalies génétiques ont été développées avec un grand succès en clinique. Cependant, des résistances secondaires à ces thérapies sont observées chez la majorité des patients. Au sein de notre unité, nous développons des programmes de recherches *in vitro* et *in vivo* visant à comprendre ces mécanismes de résistances en croisant avec les résultats cliniques obtenus. L'étude de ces mécanismes de résistances est un enjeu majeur pour la société, car cela va permettre de mieux prendre en charge les patients. L'objectif de cette étude est d'identifier les mécanismes de résistance d'un médicament (l'erdafitinib) ciblant des anomalies génétiques dans le cancer de la vessie à l'aide de modèle murin. L'utilisation d'animaux pour ce projet est indispensable du fait qu'il est impossible de reproduire *in vitro* la complexité d'un organisme. Il a été montré à plusieurs reprises que le rôle de l'environnement entourant la tumeur joue un rôle essentiel dans l'acquisition de ces résistances. Ainsi les trois objectifs principaux de cette expérimentation sont:

1/ Identifier de nouveaux mécanismes de résistance

2/ Etudier le rôle des changements structurelles de la tumeur et de son environnement.

3) Etudier si les mécanismes de résistances sont dose-dépendants.

Nous grefferons les souris avec deux lignées commerciales porteuses d'anomalies moléculaires et sensibles à l'erdafitinib. Nous avons confirmé *in vitro* la sensibilité de ces lignées et nous souhaitons établir des modèles de résistances par escalade de dose. Pour cela, nous allons traiter chacune des lignées avec quatre doses différentes (ces doses ont été évaluées chez la souris et n'ont pas entraîné de toxicité significative). La stratégie mise en place est de suivre la croissance tumorale des tumeurs et de sélectionner les tumeurs ayant bien répondu initialement à l'erdafitinib et qui développe secondairement une résistance après plusieurs semaines de traitement (afin de mimer la clinique). Les tumeurs seront ensuite analysées dans notre laboratoire pour identifier les mécanismes de résistances.

Du fait du rôle de l'environnement tumoral et de la complexité d'un être vivant (interactions immunitaires, humorales, microenvironnement). Le recours à l'animal vivant est indispensable pour étudier les mécanismes de résistance. De nombreuses études ont montré que l'interaction de la tumeur et de son microenvironnement ont un impact sur l'efficacité thérapeutique.

Afin d'éviter un trop grand nombre d'animaux, nous avons réalisé au sein de notre laboratoire des tests *in vitro* croisés avec les résultats observés en clinique nous permettant d'affiner notre hypothèse et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, les résultats de cette étude vont nous permettre de décrire et comprendre les mécanismes de résistance, ce qui pourra au final améliorer le traitement des patients. A l'aide de tests statistiques, nous avons déterminé le nombre minimum d'animaux nécessaires pour cette étude (10 souris par groupe soit un total de 100 souris pour l'étude).

Pour le bien-être animal, et pour le raffinement des expériences, nous prévoyons pour tout acte pouvant engendrer un stress ou une douleur, l'utilisation d'anesthésie et/ou d'analgésique. Afin de réduire le stress de l'animal, l'environnement sera enrichi avec du coton leur permettant de se protéger et de créer un nid. Les animaux recevront de l'aliment type Diet gel energy en cas de problème lié à l'alimentation.

6009. La pathologie thrombotiques sont parmi les premières causes de mortalité dans le monde. L'imagerie diagnostique ne dispose pas aujourd'hui d'agents de contraste spécifiques permettant une détection précoce de situations à risque ainsi que le suivi thérapeutique. Nous avons montré que le fucoïdane est un polymère naturel extrait d'algues capable de reconnaître une protéine membranaire plaquettaire, la P-sélectine, surexprimée lors de la formation d'un thrombus. A l'aide de fucoïdane radiomarqué et de nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de fucoïdane, nous avons pu réaliser l'imagerie scintigraphique (TEMP) et par résonance magnétique d'anévrismes de l'aorte abdominale dans un modèle de rat. Ce projet concerne la validation de cette approche avec des nanoparticules recouvertes de fucoïdane à l'aide d'un procédé industriel innovant de greffage. Outre l'imagerie des anévrismes, la toxicité tissulaire à court terme de ces nouvelles nanoparticules sera évaluée par des études de biodistribution. A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation de rats pour modéliser le développement de la pathologie thrombotique. Le nombre de rats utilisés pour la période du projet a été évalué à 72. Pour réaliser ce projet nous avons tenu compte du nombre d'animaux à évaluer de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Les procédures comportent des gestes de chirurgie par une personne expérimentée de façon à éviter toute douleur à l'animal, nous ferons le suivi du bien être animale pendant toute la durée du projet.

6010. Le choc hémorragique est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. La cause d'hémorragie la plus fréquente et la plus grave est traumatique. Le choc hémorragique touche des sujets jeunes, victimes d'accidents ou d'agressions. Malgré les avancées de la réanimation, l'hémorragie reste à l'origine de 40% des décès des traumatisés graves. C'est la principale cause de décès des sujets jeunes. Pour maintenir en vie les patients en attendant le contrôle chirurgical du saignement, la prise en charge du choc hémorragique vise à conserver une perfusion minimum des organes vitaux. Pour cela, il faut administrer du remplissage vasculaire (fluide) dès le début de la prise en charge en ciblant des objectifs

hémodynamiques simples exprimés en niveau de pression artérielle. Il est également souvent nécessaire d'administrer des catécholamines pour maintenir la pression artérielle. Cette phase vise un compromis entre maintenir une pression suffisante pour perfuser les organes vitaux et éviter une pression trop élevée qui entraînerait une majoration du saignement des brèches vasculaires. Les objectifs définis dans les recommandations européennes sont un objectif de 80 à 90 mm Hg de Pression Artérielle Systolique (PAS) ou de 90mmHg de Pression Artérielle Moyenne (PAM) en cas de traumatisme crânien associé. Cependant, l'administration de remplissage vasculaire n'est pas standardisée. Il est recommandé de perfuser le minimum nécessaire pour éviter de diluer les facteurs de coagulation et ne pas dépasser les objectifs de pression artérielle fixés. En pratique, le maintien d'une pression artérielle dans l'objectif est très compliqué. De plus, en cas de prise en charge de nombreuses victimes (accidents ou attentats) il est impossible d'optimiser le traitement individuel. Nous développons actuellement un dispositif de traitement automatisé du choc hémorragique permettant d'administrer automatiquement les thérapeutiques nécessaires (remplissage et drogues). Nous pensons qu'il peut améliorer la prise en charge hémodynamique en apportant la quantité de traitement nécessaire tout en évitant les sous et surdosages. Nous avons sélectionné des algorithmes après une première phase de test chez le rongeur. L'objectif principal de ce projet est de valider le dispositif, dans un modèle animal aux caractéristiques hémodynamiques proches de l'homme, avant de passer aux études cliniques.

L'étude visera en particulier à :

- valider la fiabilité des algorithmes et du dispositif animal *in vivo* sur gros animal (Porc).
- comparer le traitement manuel au traitement automatisé.
- optimiser la performance des algorithmes.

L'impact des différentes stratégies de réanimation sur les conséquences du choc sera étudié de manière multiparamétrique : mesure dynamique continue du lactate et de sa clairance, mesure du débit cardiaque, mesure de la microcirculation intestinale et sublinguale, mesure de l'oxygénation tissulaire intestinale et mesure de la perfusion rénale.

Ces expérimentations *in vivo* utilisent un modèle de choc hémorragique et 64 porcs maximum seront nécessaires à la réalisation de ce projet. Le modèle est particulièrement adapté à l'étude de la réponse hémodynamique chez le gros animal (porc) pour ce qui est de la validation de la réponse de l'algorithme du prototype avec un animal au débit cardiaque proche de l'homme.

L'ensemble de cette procédure sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie.

Nous utiliserons dans cette étude 64 porcs qui seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2m2 lors de la période d'acclimatation (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire ainsi les stress. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, « médecine ball », jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...).

6011. 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 Pharmacologie chez le furet 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 furet se justifie par la nécessité d'une forte analogie entre l'animal et l'Homme ce qui est le cas en ce qui concerne le fonctionnement du système vomitif. Il faut également prendre 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 112 animaux. Le nombre important d'animaux utilisé s'explique par la quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Les dommages sont inhérents aux études précliniques, qui consistent à administrer des 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. 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. Ils sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet et disposent d'un programme d'enrichissement. Les furets sont des animaux socialisés en permanence hormis lors des observations ou des enregistrements. Ils 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 termes 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 utilisé, 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.

6012. La technologie des anticorps monoclonaux murins des Prix Nobel Köhler et Milstein est couramment utilisée pour développer des anticorps destinés à la recherche, au diagnostic et maintenant à la thérapie.

Le but ultime est de générer des cellules hybrides capables de produire des anticorps monoclonaux de très haute spécificité, *in vitro* et à l'infini.

Les différentes techniques, pour obtenir les clones producteurs d'anticorps qui seront dès lors cultivés *in vitro* à l'infini nécessitent l'utilisation d'au moins un animal comme source de cellules B productrices d'anticorps.

Chez la souris, la principale source de cellules B immunocompétentes est la rate avec un potentiel de multiplication de ces cellules bien supérieur aux autres organes lymphoïdes.

Pour obtenir des cellules B de compétence recherchée en très grand nombre, deux étapes dans la vie de l'animal utilisé sont requises

- 1- L'immunisation de l'animal : trois injections, sur une période d'un mois, avec la cible (virus, bactéries, cellules) contre laquelle on veut générer un anticorps,
- 2- Le sacrifice de l'animal : euthanasie faite à un temps bien précis et sous asepsie pour prélever la rate qui servira de source de cellules B.

Si par le passé, il fallait un grand nombre de souris pour réaliser un programme anticorps monoclonaux, notre protocole d'immunisation, le choix de l'animal et la performance de notre savoir-faire technologique pour la création d'hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux spécifiques, nous ont permis de n'utiliser qu'une seule souris.

Ce savoir-faire nous permet également d'utiliser une seule souris pour plusieurs cibles indépendantes les unes des autres, avec des performances réelles.

Le choix de l'animal a également son importance. Pour créer des hybridomes producteurs d'anticorps, nous utilisons une cellule particulière qu'on va fusionner (hybrider) avec la cellule B isolée de la souris : la cellule SP2O qui est un myélome provenant à l'origine d'une souris Balbc/Byj.

Il est important de conserver l'histocompatibilité entre la cellule B de la souris et le myélome SP2O, pour obtenir un fort rendement en hybrides qui soient stables dans le temps.

La souris Balbc/Byj est de fait privilégiée : elle sera axénique et relativement jeune (environ 1 mois), pour être assuré d'avoir un système immunocompétent vierge pouvant réagir de manière optimale à la vaccination, et donner des cellules B développant des anticorps de très haute affinité.

Le projet de production d'anticorps monoclonaux murins prévoit de réaliser 10 programmes de fusion par an. Le nombre total d'animaux nécessaire pour ce projet est, dès lors, de 50 souris sur une période de 5 années.

Le respect du choix de cet animal et des protocoles associés permettent de réduire très significativement le nombre d'animaux nécessaires à la création d'anticorps monoclonaux.

Le protocole d'immunisation associé à la création de ces anticorps a été optimisé de façon à permettre la réduction du nombre des animaux. Cette réduction est obtenue en respectant deux points très importants : la diminution du stress et les conditions de stabulation.

Il est évident que pour avoir une bonne immunisation, l'intégrité de l'animal ne doit pas être altérée. Plusieurs facteurs peuvent intervenir :

- 1- La qualité de l'antigène : celui-ci ne doit pas avoir d'effet délétère. On veillera notamment à ce qu'il ne contienne pas de pathogènes, de substances chimiques nocives..., qu'il soit le plus naturel possible.
- 2- L'utilisation de l'adjuvant de Freund induit un état fébrile temporaire ; celui-ci est compensé par plusieurs actions, comme la stabulation à 25°C pour lutter contre l'hypothermie temporaire, le contrôle visuel systématique des animaux vaccinés pendant les premières heures post injection, l'ajout d'un animal sentinelle pour reconforter les animaux ayant subi une injection.
- 3- L'état général de l'animal ayant un effet immédiat sur les performances d'immunisation, un effort est apporté sur l'enrichissement (tunnel en carton, roue, papier ... permettant un exercice physique de l'animal qui va compenser l'état de prostration temporaire).

6013. L'obésité est devenue depuis 20 ans une pandémie mondiale et la prise en charge de celle-ci et de ses pathologies associées (dyslipidémie, diabète, stéatose hépatique, hypertension artérielle, etc.) constitue un enjeu majeur en santé publique. L'obésité maternelle pendant la grossesse a un impact très fort sur le risque d'obésité précoce de la descendance et sur le développement ultérieur de pathologies cardiovasculaires et métaboliques avec, à terme, une augmentation de la morbi-mortalité. La chirurgie bariatrique s'est progressivement placée au premier rang des traitements efficaces en termes de perte de poids et de résolution des comorbidités, mais il n'existe actuellement aucune donnée clinique ou expérimentale concernant son impact sur la descendance de mères obèses opérées.

Le but de cette expérimentation animale chez le rat est d'apporter des preuves de l'efficacité de la chirurgie bariatrique sur l'amélioration du pronostic pondéral et métabolique des descendants de mères obèses opérées. Pour cela, nous allons induire une obésité chez 60 rates Sprague-Dawley par un régime alimentaire "high fat high sugar" pendant 6 semaines. Ces femelles seront alors opérées soit d'une « sleeve » gastrectomie (intervention restrictive), soit d'un by-pass gastrique (intervention restrictive et malabsorptive), soit d'une laparotomie blanche avec biopsie hépatique simple. Un groupe de 20 rates contrôle non obèse aura également une laparotomie blanche.

Après un mois d'amaigrissement post-opératoire, les femelles seront mises en accouplement et suivies quotidiennement durant leur gestation. Après le sevrage des portées, les altérations métaboliques, hépatiques et cardio-vasculaires seront évaluées chez les mères au sacrifice des animaux. Ces mêmes altérations seront étudiées chez les descendants (mâles et femelles) de ces mères à l'âge de 3, 6, 12 et 18 mois.

Au total, en incluant la mortalité opératoire, il est prévu d'utiliser 120 femelles rats, 20 mâles reproducteurs et de suivre 320 animaux de leur descendance. Le respect de la règle des 3R passe par l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux pour obtenir des groupes permettant d'avoir des données statistiquement significatives et l'utilisation d'analgésiques et d'antalgiques adaptés à toutes les étapes du protocole.

6014. Pour être en conformité avec la réglementation des pays hors Europe (essai de contrôle qualité dans le cadre de la libération des lots de vaccins), ou lors d'un changement de « process » important dans la fabrication des vaccins, ou lors de demande d'études de stabilité, il est nécessaire de contrôler l'innocuité de chaque lot de vaccin destiné au chien ou au chat sur deux animaux de l'espèce correspondante.

Cet essai consiste à injecter à deux animaux (aucune méthode de substitution ne peut être utilisée) deux doses (vaccins inactivés) ou dix doses (vaccins vivants), et de suivre les animaux sur un plan général et local au point d'injection afin de vérifier l'innocuité du lot. Les procédures sont très cadrées règlementairement et peu de contraintes expérimentales sont imposées aux animaux.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment l'enrichissement apporté dans les enclos des animaux, la mise en place des périodes de jeu, l'hébergement par binôme pour les chiens, en chatterie pour les chats.

450 carnivores domestiques seront utilisés pour ce projet sur une période de 5 ans.

Une procédure d'adoption est en place pour ces animaux.

6015. L'épilepsie, qui touche 1% de la population, constitue un problème de santé majeur. En dépit de nombreuses avancées thérapeutiques, seules 30% des épilepsies pharmaco-résistantes (celles qui ne répondent pas aux médicaments) sont opérables. Et cette option de chirurgie de résection n'est envisageable que si le foyer se situe dans une zone accessible du cerveau.

Dans les autres cas, une autre approche thérapeutique est l'inhibition des crises d'épilepsie par refroidissement du tissu cérébral. Ce phénomène, connu depuis les années 1930, a été validé chez le rongeur à l'aide de dispositifs de refroidissement appliqués à la surface du cerveau. Ce projet a pour objectif de valider le principe de refroidissement localisé permettant un arrêt de la crise épileptique sur un modèle de primate. Cette technique a l'avantage d'être réversible et d'être une procédure peu invasive, mais elle doit encore être affinée en vue d'une application thérapeutique.

L'objectif scientifique de notre étude est donc de déterminer les paramètres de refroidissement qui seront nécessaires à la conception d'un dispositif implantable chez l'homme, capable de détecter précocement une crise d'épilepsie émergente et de l'inhiber en activant un refroidissement localisé de la zone épileptogène profonde.

Un dispositif préclinique permettant un refroidissement localisé en profondeur sera développé. Le projet sera divisé en deux phases : tout d'abord une mise au point du modèle primate épileptique pour pouvoir reproduire les crises épileptiques de façon stables et prévisibles. Puis la seconde partie sera centrée sur les effets et l'optimisation du refroidissement sur ces crises déjà bien établies, pour bien déterminer quelles sont les températures nécessaires pour avoir le maximum d'effets. Un modèle alternatif *ex vivo* n'existant pas, le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 6 primates, provenant d'élevages reconnus, afin d'assurer la validité des résultats. Le modèle primate sera utilisé en raison de ses similitudes anatomiques fortes avec l'Homme, permettant une extrapolation aux conditions d'utilisation de l'implant en pratique clinique. Les protocoles d'anesthésie ont été définis et validés par le vétérinaire de l'installation et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance ou douleur lors des interventions sur les animaux. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux assureront leur bien-être.

6016. Depuis quelques années, avec le développement de la chirurgie ambulatoire, une grande attention est portée à tous les aspects de la prise en charge péri-opératoire des patients pour réduire le caractère agressif de l'acte chirurgical et améliorer les suites opératoires: prise en charge de la douleur, anesthésie, anti-inflammatoires... Ces différents éléments de prise en charge sont regroupés en une approche multimodale appelée réhabilitation rapide après chirurgie programmée (ERAS), développée au départ dans le cadre de la chirurgie digestive. Un élément de cette approche qui fait l'objet de discussion est la limitation du jeûne préopératoire par l'administration de boissons glucidiques jusqu'à deux heures avant l'intervention. En effet, le jeûne préopératoire et le stress chirurgical entraînent une diminution de la sensibilité des muscles et du foie à l'action de l'insuline et serait responsable d'une augmentation des complications et d'un allongement de la durée d'hospitalisation. L'efficacité de cette stratégie est très discutée d'autant que les modalités de cette limitation du jeûne demandent à être précisées. Les travaux actuels se sont focalisés uniquement sur l'apport en glucides sur la base du rôle du glucose dans la sécrétion et l'action de l'insuline. Or, d'autres nutriments, en particulier des acides aminés tels que la glutamine, sont connus pour leur action sur l'insulino-sécrétion et l'insulino-sensibilité. Notre hypothèse de travail est que l'addition de glutamine à des solutions glucidiques administrées en préopératoire devrait permettre d'optimiser l'effet de ces dernières sur la réponse inflammatoire et l'insulino-résistance induites par le stress chirurgical.

Le but de ce projet est d'évaluer l'efficacité de différentes solutions riches en glucides et acides aminés administrées en préopératoire sur le stress postopératoire chez le jeune rat adulte.

Ce projet en deux parties sera réalisé chez des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 8 semaines subissant une résection intestinale sous anesthésie à l'isoflurane. Un total de 172 animaux sera nécessaire pour ce projet.

Ce projet est réalisé dans le cadre de l'évaluation et du développement de produits de nutrition préopératoire. Les animaux seront maintenus en cage à métabolisme jusqu'à 72 heures après l'intervention, pour permettre le suivi de la prise alimentaire et le recueil urinaire, pour explorer la dégradation protéique, à jeun ou après mesure de la synthèse protéique. Les animaux bénéficieront d'un traitement antalgique pré- et postopératoire. Une première étude évaluera la cinétique de réponse à la chirurgie. Des animaux opérés

seront suivi pendant 24, 48 et 72 heures après l'intervention pour une étude cinétique et comparés à des animaux témoins. Dans la seconde, l'influence de trois solutions de glucides et d'acides aminés administrés avant la chirurgie sera étudiée par rapport à des animaux simplement à jeun, les animaux étant étudiés au maximum de la réponse à la chirurgie. Une surveillance quotidienne de tous les animaux sera mise en place tout au long de l'expérimentation afin de dépister et le cas échéant de remédier à une éventuelle souffrance animale.

6017. L'alimentation représente 60% du coût de production en élevage porcin. Les porcs sont généralement alimentés à volonté, ce qui conduit à une augmentation importante des quantités ingérées à la fin de la période d'engraissement, générant des pertes économiques et des nuisances environnementales. A l'inverse, de faibles quantités ingérées par de jeunes porcelets sevrés peuvent entraîner des désordres digestifs et limiter leur croissance. Il est donc important d'optimiser l'ingestion volontaire des porcs, pour ajuster au plus près les apports nutritionnels aux besoins des animaux et ainsi réduire le coût de l'alimentation.

L'objectif de ce projet est d'étudier les dynamiques d'ingestion et de déterminer les mécanismes sous-jacents qui régulent l'ingestion volontaire chez le porc. Il se déclinera en 4 études correspondant à deux stades physiologiques : croissance et finition. Un total de 192 porcs sera utilisé pour ce projet, 96 porcs de 35 kg et 96 porcs de 70 kg.

Pour chaque stade physiologique, les mesures consisteront en la mesure des performances de croissance), la caractérisation de la dynamique d'ingestion volontaire (nombre de repas, vitesse d'ingestion, quantité ingérée) et l'étude des mécanismes de régulations (hormones, statut énergétique). Dans le but de trouver des solutions nutritionnelles limitant l'ingestion en fin d'engraissement, les animaux seront nourris soit d'un aliment standard, soit d'un aliment induisant une diminution de la prise alimentaire.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car le projet porte sur l'étude de la régulation de l'ingéré volontaire qui ne peut être évaluée *in vitro* ou par modélisation. Réduction : le nombre d'animaux a été minimisé et adapté aux procédures expérimentales. Raffinement : les conditions d'hébergement seront les meilleurs possibles pour ce type d'étude en permettant aux animaux une liberté de mouvement.

6018. A partir du 1 janvier 2018, le passage à une alimentation 100% bio représentera un défi important pour les fabricants d'aliments car les besoins en acides aminés (AA) du porc devront être couverts seulement en combinant au mieux les ressources « bio » riches en protéines afin d'éviter des carences préjudiciables aux performances. En pratique, cela demande de connaître très finement la valeur protéique des matières premières riches en protéines (MPRP) biologiques. A ce jour, les MPRP bio disponibles sont principalement les tourteaux de soja, de tournesol (et dans une moins mesure le tourteau de colza) mais également les différentes variétés de pois. Pour ces différentes matières premières, les teneurs en AA digestibles ne sont pas connues et/ou demandent à être précisées pour prendre en compte les spécificités (conditions agronomiques de production, procédés de trituration, etc.) imposées par la filière Bio. Dans cet essai, les matières premières (n=8) seront incorporées à un taux de 25% dans des régimes contenant de la caséine et de l'amidon de maïs. Les régimes obtenus seront testés sur 8 porcs dans un dispositif comportant 2 carrés latin menés simultanément.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement: les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est de déterminer l'utilisation digestive des acides aminés au niveau iléale et il n'est pas possible d'étudier l'utilisation digestive des nutriments autrement que sur un animal entier et vivant. Réduction : le nombre d'animaux (n=8) et le dispositif expérimental mis en place ont été déterminés sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité pour l'intégration des résultats du projet dans des tables de composition nutritionnelle tout en limitant le nombre d'animaux et la durée d'hébergement dans des cages à digestibilité. Dans notre essai, les mesures sont réalisées au niveau iléal et la variabilité entre les individus est réduite (grâce au dispositif expérimental en carré-latin). Raffinement: l'anastomose iléo-rectale est la seule méthode permettant de collecter quantitativement les digestats de la fin de l'intestin grêle. Elle est mise en place sous anesthésie générale et une analgésie est appliquée pendant l'intervention et au cours de la période post-opératoire avec un suivi très attentif des animaux pendant toute la durée de l'expérience.

6019. La chimiothérapie contre les cancers provoque des effets secondaires toxiques. La toxicité au niveau du cœur est particulièrement dangereuse. Elle représente l'effet secondaire majeur de différents traitements anti-cancéreux, en particulier ceux qui utilisent des drogues du groupe des anthracyclines. Cette cardiotoxicité peut se manifester plusieurs années après la thérapie et elle est souvent irréversible. Les mécanismes sous-jacents restent mal connus, et il n'existe pas de stratégie efficace et ciblée pour prévenir ou traiter cette toxicité cardiaque. Comme le nombre de survivants des maladies cancéreuses s'accroît, les effets secondaires liés à la chimiothérapie deviennent un problème majeur de santé publique. Par conséquent, il devient urgent de traduire des résultats de la recherche fondamentale en applications cliniques potentielles.

Nos recherches antérieures *in vitro* et *ex vivo* chez le rat ont identifié un mécanisme régulateur du métabolisme cardiaque comme une cible majeure des agents chimiothérapeutiques. Ce mécanisme fait l'objet de l'étude proposée ici. Elle utilisera un modèle animal préclinique *in vivo* : des souris soumises à une chimiothérapie qui affecte le fonctionnement cardiaque. Le but du projet sera (i) de valider les résultats prometteurs des études antérieures obtenues sur des modèles *ex vivo*, (ii) de mieux comprendre le dysfonctionnement du mécanisme régulateur identifié au niveau du cœur dans l'animal *in vivo* et (iii) de tester de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques qui ciblent cette régulation. Pour cela, l'étude va faire appel à des souris transgéniques, dont une protéine clé de cette régulation sera rendue non fonctionnelle spécifiquement dans le cœur de la souris adulte. Nous allons ainsi pouvoir étudier l'effet de l'absence de cette protéine sur le développement de la cardiotoxicité et son rôle dans des traitements cardioprotecteurs. En effet, ce mécanisme régulateur présente un site d'action cardioprotecteur, car son activation pourrait prévenir



l'apparition des effets secondaires cardiaques ou même diminuer rétroactivement les conséquences de ces effets secondaires. Nous testerons donc un traitement par une molécule de type polyphénol, connue pour activer le mécanisme ciblé, et dont les effets bénéfiques sur le cœur et les vaisseaux ont été démontrés.

Le modèle *in vivo* utilisé dans cette étude est conforme aux dernières directives dans le domaine de la cardio-oncologie, en particulier en s'approchant de la pathologie humaine par l'étude de la cardiotoxicité chronique qui se manifeste après un certain délai. L'étude, qui inclut 210 souris au total, respectera la règle des 3R. Remplacer : Basé sur les résultats publiés par notre équipe et d'autres groupes, nous allons utiliser aussi les modèles alternatifs aux modèles *in vivo* (cardiomyocytes en culture, cœur perfusé). Réduire : Le nombre d'animaux a été déterminé sur la base d'études publiées pour donner la puissance statistique adéquate avec un minimum d'animaux. Le protocole du traitement par l'agent anticancéreux a été défini sur la base de travaux publiés pour permettre le gain d'un maximum d'informations à partir des individus étudiés. L'exploitation maximale de matériel biologique est prévue dans le protocole (différents organes vont être prélevés et différents dosages réalisés). Le schéma des groupes expérimentaux permet de reproduire et d'utiliser des animaux d'une manière la plus avantageuse. Raffiner : Choix du modèle (traitement chronique chez la souris) et des procédures (dose et durée du traitement de chimiothérapie, choix des points limites, procédures d'euthanasie) ont été faits conformément à l'état actuel des connaissances et exigences envers ce type d'étude.

6020. La sclérose en plaques (SEP) fait intervenir des mécanismes auto-immuns complexes qui agressent les cellules qui synthétisent la gaine de myéline protectrice dans le système nerveux central. Ce phénomène entraîne des lésions à l'aspect scléreux (épais et dur), lésions appelées plaques, d'où le nom de la maladie. Elles traduisent une démyélinisation et souvent le début d'une dégénérescence axonale.

Les traitements disponibles à ce jour ne permettent pas de guérir, mais ils préviennent les poussées dans les formes récurrentes. Ils ne présentent pas d'efficacité sur les formes progressives de la maladie.

L'injection d'interféron bêta plusieurs fois par semaine reste une thérapie de choix pour le traitement de la sclérose en plaque. Néanmoins, ces injections répétées sont associées à des réactions inflammatoires au niveau du site d'injection. Aujourd'hui, il est donc indispensable de penser à des méthodes innovantes permettant la diffusion du médicament de manière plus compatible avec la clinique.

Scientifiques et industriels travaillent depuis des années au développement de micro-équipements capables de suivre, voire d'agir, sur les influx nerveux et électriques du corps humain. La plupart de ces projets sont toujours à un stade très expérimental. Dans le cas du traitement de la sclérose en plaque par injection d'interféron bêta, le développement d'implants bioélectroniques cellulaires permettrait d'offrir une alternative efficace aux injections répétées.

Notre projet vise donc à développer un dispositif constitué d'une "chambre" (l'implant) contenant des cellules génétiquement modifiées pour sécréter de l'interféron bêta.

Après anesthésie, une chirurgie des animaux permettra l'implantation du dispositif électronique au niveau de la région lombaire sous cutanée. Une analgésie sera immédiatement induite sur l'animal afin de prévenir toutes douleurs post-opératoires. Cet implant électronique est alimenté par un dispositif sans fil. Une interface optique permet de contrôler à distance les cellules vivantes pour l'expression des gènes codant les protéines thérapeutiques. Les parois de cette chambre sont des membranes semi-perméables laissant diffuser les protéines thérapeutiques. Le confinement des cellules dans l'implant permet au dispositif d'être facilement implanté ou enlevé.

La nouveauté de l'approche réside dans le contrôle de la sécrétion de protéines à visée thérapeutique *in situ*. L'action thérapeutique associée à un dosage fin de la thérapie préviendrait les réactions immunitaires indésirables comme la douleur et l'irritation locale au site d'injection.

Dans le cadre de ce projet, l'implant bioélectronique programmé pour délivrer un médicament, l'interféron bêta chez le modèle de sclérose en plaque, sera implanté chez l'animal anesthésié. Ce projet ne peut pas être réalisé *in vitro* car les cellules en culture ne peuvent représenter le système immunitaire complet d'un être vivant.

Pour vérifier que les implants délivrent bien les cellules et l'interféron bêta injecté, la technique d'imagerie TEP est utilisée, technique non invasive pour l'animal. Les tests préliminaires ont été réalisés *in vitro* et montre la faisabilité de prototypes bioélectroniques.

Le projet prévoit d'utiliser 344 rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés. Leur nombre a été réduit à un minimum nécessaire pour permettre l'interprétation des résultats par des tests statistiques. De plus, afin d'éviter l'utilisation d'animaux supplémentaires, les échantillons et prélèvements sanguins des animaux seront distribués aux différents groupes de chercheurs prenant part à ce projet de recherche.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe de vétérinaire. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, et 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 sont hébergés en groupe dans des cages, enrichies de modules permettant de diversifier leurs activités, et sont observés au quotidien par une équipe en charge de leurs soins.

6021. La pharmacocinétique étudie le devenir de la molécule dans l'organisme. Le devenir du médicament selon les doses utilisées et sa voie d'administration est étudiée chez l'animal: son absorption, sa distribution par la circulation sanguine, son métabolisme, son élimination.

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

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 lapins, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins répétés.

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 350 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 1050 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 soit par ponction directe soit par ponction indirecte par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans une veine auriculaire.

Les prélèvements sanguins réalisés par ponction directe se font en introduisant une aiguille soit au niveau de la veine jugulaire ou auriculaire soit au niveau de l'artère auriculaire.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe ou de façon individuelle (s'il y a que des lapins mâles ou si demandé par le protocole) dans des cages comprenant du matériel d'enrichissement adapté (ex: tablette cachette, buchette à ronger...) et en ayant un contact visuel avec ses congénères. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress lié à la contention.

6022. Les primates non humains sont utilisés pour la recherche préclinique dans le domaine de la santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études de pharmacocinétique dont le but est de suivre la concentration d'un produit d'intérêt médical dans le sang au cours du temps.

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 primates non humains, 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 l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un produit dans l'organisme des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier un produit.

Ce projet englobe plusieurs études. Au maximum nous prévoyons de réaliser des études pharmacocinétiques de 130 produits 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 390 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 fémorale, à la veine céphalique ou à la saphène.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe ou de façon individuelle (pendant les périodes de prélèvements de sang rapprochés ou si demandé par le protocole) dans des hébergements comprenant du matériel d'enrichissement adapté et en ayant un contact visuel avec ses congénères. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress lié à la contention.

6023. La pharmacocinétique étudie le devenir de la molécule dans l'organisme. Le devenir du médicament selon les doses utilisées et sa voie d'administration est étudiée chez l'animal: son absorption, sa distribution par la circulation sanguine, son métabolisme, son élimination. Les chats sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans les domaines de santé animale (espèce cible).

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 chats, 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 200 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 1800 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.

Ces prélèvements pourront parfois être associés à des prélèvements urinaires qui se feront soit par miction spontanée soit par cathétérisation urétrale ou par cystocentèse.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés généralement par groupe ou en individuel si demandé par le protocole. Dans le cas d'hébergement individuel, une attention particulière sera portée au raffinement et à un enrichissement du milieu adapté pour éviter l'ennui: contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, présence de jouets, de tablettes...

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress lié à la contention.

6024. La dystrophie myotonique de Steinert (ou DM1) est une pathologie génétique, dominante, touchant 1 personne sur 8000 en France, elle est caractérisée notamment par une faiblesse musculaire, une myotonie, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence et des anomalies cognitives et du comportement. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie. Jusqu'à présent, ce sont principalement les altérations musculaires et cardiaques qui ont été étudiées. Or, le cerveau présente également des modifications significatives révélées par imagerie par exemple. Afin d'étudier cette maladie au niveau cérébral, nous utiliserons un modèle reconnu de lignées de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1, présentant chacune des caractéristiques proches des différents symptômes humains.

Nous étudierons plus particulièrement le glutamate, qui est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central et dont les protéines de régulation (appelées transporteurs) ont des taux altérés à la fois chez les patients et les souris mutées DM1. Le projet de recherche fondamentale que nous mènerons pendant 3 ans vise à évaluer la capacité de ces transporteurs cérébraux, moins exprimés et donc moins nombreux, à réguler les taux extracellulaires du glutamate de ces souris. Nous nous intéresserons plus particulièrement à deux structures cérébrales impliquées l'un et l'autre dans les déficits intellectuels, mais aussi riches en neurones à glutamate : le cortex frontal et l'hippocampe dorsal. Si la capacité des transporteurs à glutamate était bien trouvée déficiente, l'effet d'un traitement pharmacologique connu pour stimuler la synthèse de ces transporteurs serait alors évalué dans ces deux mêmes zones cérébrales.

Les résultats de notre étude devraient permettre de mieux connaître les conséquences cérébrales de la mutation génétique mais aussi d'évaluer une nouvelle piste médicamenteuse pour cette pathologie rare.

Notre étude consiste à utiliser des procédures de la littérature reconnues et réalisées dans le respect de l'éthique animal. Cent quarante-quatre souris (144 au maximum) devraient être utilisés sur les trois années que durera ce projet qui étudiera deux structures cérébrales avec trois lignées différentes (deux lignées avec mutation et une saine), en présence ou en absence d'un traitement pharmacologique visant à restaurer la capacité de transport du glutamate. Nous réduirons le plus possible le nombre d'animaux utilisés en nous basant à la fois sur notre propre expérience et les tests statistiques. Nous garderons nos animaux dans des conditions d'hébergement et d'asepsies appropriées (milieux enrichis et environnement exempt d'organismes pathogènes) et nous utiliserons les stratégies expérimentales les plus adaptées pour minimiser leur souffrance. Nous mettrons en place un suivi clinique quotidien des animaux.

6025. Ce projet a pour objectif de produire du sérum et du sang total de chien qui sont nécessaires, et ne peuvent être remplacés, pour assurer la production d'un médicament à usage vétérinaire (vaccin). Ce médicament permet de prévenir une maladie grave chez le chien en médecine vétérinaire.

Les volumes nécessaires peuvent être atteints en prélevant un pool de chiens de grande taille (plus de 25 kgs) de 90 animaux, ce qui correspond à une utilisation totale de 160 chiens sur 5 ans. Les animaux prélevés régulièrement ne sont pas euthanasiés à l'issue de la procédure expérimentale de prélèvement qui est arrêtée lorsque l'animal est âgé de 8 ans, âge à partir duquel il sera suivi en gériatrie (prostate...).

Pendant toute la durée du projet, les animaux sont hébergés en zone dédiée dans des conditions qui tiennent compte de leur bien-être. Les procédures expérimentales sont de gravité légère (contrainte équivalente à une piqûre d'aiguille). Un suivi étroit de la santé des animaux est réalisé pour éviter tout risque lié aux prélèvements sanguins.

6026. Le cancer pancréatique est en augmentation croissante, son incidence a été multipliée par plus de deux depuis les années 1980. En 2015, l'incidence estimée en France était de 11328 nouveaux cas et l'espérance de vie à 5 ans est seulement de 5%. Malgré l'accroissement du nombre de molécules chimiothérapeutiques, les progrès thérapeutiques restent encore modestes. L'un des obstacles majeurs réside en effet dans l'absence de délivrance spécifique de ces molécules dans le tissu tumoral. De plus, la majorité de ces substances provoque des effets indésirables sur les tissus sains. Par ailleurs, la présence de barrières biologiques (ex : barrière endothéliale) limite le passage de ces molécules du sang vers le tissu tumoral, restreignant ainsi leurs efficacités thérapeutiques. Dans ce contexte, ce projet a pour objectif de valider une technologie ultrasonore, la sonoporation, pour la délivrance ciblée du nab-paclitaxel (molécule chimiothérapeutique) et du cetuximab (anticorps thérapeutique) dans un modèle murin de cancer pancréatique (souris mâles). Nous évaluerons les effets de la délivrance par sonoporation de ces monothérapies (nab-paclitaxel et cetuximab) et de leur combinaison sur la croissance tumorale par des techniques d'imagerie non-invasive. Nous souhaitons corrélérer l'efficacité thérapeutique de cette stratégie à la biodistribution intratumorale de ces molécules thérapeutiques. Cette nouvelle approche thérapeutique pourrait devenir une méthode prometteuse dans le traitement du cancer pancréatique.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par: Remplacement : Dans une première approche expérimentale, nous avons réalisé des expériences *in vitro* dont les résultats sont particulièrement encourageants et nécessitent d'être validés avec un modèle préclinique. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*. Réduire : le nombre minimal d'animaux (212 souris) pour obtenir des résultats interprétables a été calculé à partir de

résultats obtenus lors d'expérimentations préliminaires. Raffinement: Les souris seront hébergées par lot de 10 souris en présence d'un objet d'enrichissement (coton, morceaux de carton). Les animaux développant une tumeur seront observés une fois par jour.

6027. La dénutrition est un facteur de risque d'augmentation de la morbi-mortalité et de prolongation de la durée d'hospitalisation, quelle que soit la catégorie de patients. Par conséquent, elle doit faire partie intégrante de la prise en charge thérapeutique de ces derniers. Le recours à la nutrition parentérale est obligatoire lorsque la voie entérale est contre-indiquée ou insuffisante, cependant, l'administration de nutrition parentérale provoque très fréquemment des hyperglycémies pouvant être délétères et nécessitant la mise en place d'un traitement hypoglycémiant par insulinothérapie, y compris chez des patients non diabétiques. L'ajout d'insuline dans les poches de nutrition parentérale n'est recommandé par les sociétés savantes de nutrition entérale et parentérale, que si sa stabilité ainsi que celle du mélange de nutrition parentérale ont été respectivement démontrées. La présente étude s'inscrit dans cette situation. L'objectif principal est de mettre en évidence la perte ou le maintien de l'activité biologique hypoglycémiant de l'insuline après son ajout dans un mélange de nutrition parentérale ternaire supplémenté en vitamines et oligo-éléments. Cette étude s'appuiera sur des données d'expérimentation animale menée chez le lapin. La règle des 3R est respectée dans notre protocole. Aucune solution *in vitro* ne saurait remplacer l'emploi d'animaux. Le nombre d'animaux nécessaire sera de 12 afin de garantir une puissance statistique suffisante tout en limitant le nombre d'animaux. Les lapins se verront administrer au moyen d'une pompe spécifique, un mélange de nutrition parentérale ternaire (composé de glucides, acides aminés et lipides, les trois macronutriments indispensables) enrichi en vitamines et oligo-éléments. Ce dernier sera supplémenté par un ajout d'insuline humaine recombinante. L'administration de la nutrition parentérale ainsi que les prélèvements seront facilités par l'emploi d'un cathéter de dimension adaptée. Des prélèvements sanguins destinés à la réalisation d'une cinétique seront effectués au niveau de la veine marginale de l'oreille des animaux. Des dosages glycémiques et insulinémiques seront réalisés à partir de ces prélèvements au moyen de méthodes immunométriques validées dans un milieu sérique. Une seconde partie du protocole consistera à mener cette même étude sur les animaux rendus diabétiques afin de s'affranchir de leur propre sécrétion d'insuline. Cela permettra de déterminer la réactivité croisée des kits immunométriques de dosage de l'insuline, vis à vis de l'insuline de lapin et de conforter les résultats de la première partie du protocole. La réutilisation des animaux du premier protocole permet de réduire le nombre total d'animaux employés. Les animaux seront mis à jeun dans les 6 heures précédant les expériences, afin de limiter leur inconfort durant la période de 2 heures de perfusion de la nutrition parentérale. En dehors des périodes d'expérimentation, ils bénéficieront de nourriture et d'hydratation ad libitum, ainsi que d'un cycle jour/nuit de 12h/12h, au sein d'une animalerie agréée, dont l'autorité de tutelle a signé la Charte nationale portant sur l'éthique de l'expérimentation animale. Seule la douleur infligée lors de la pose du cathéter est envisagée et celle-ci se verra atténuée au moyen de l'emploi d'une crème anesthésiante. Les animaux seront hébergés par binôme au sein de l'animalerie avec une maîtrise des températures et un enrichissement dans les cages. Des points limites (perte de poids supérieure à 20% en deux semaines, signes d'insuffisance cardiaque post administration...) seront appliqués.

6028. Depuis la crise de la « vache folle » (Encéphalopathie Spongiforme Bovine-ESB) et l'émergence du nouveau variant de la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'Homme en 1996 (contamination à partir de produits bovins atteints d'ESB), la question de la transmissibilité à l'homme (risque zoonotique) des agents responsables de maladies à prions chez les espèces de rente (bovins, ovins, caprins) fait l'objet d'une attention particulière de la part des pouvoirs publics.

Dans ce contexte, plusieurs projets internationaux ont été mis en place, ayant pour but la caractérisation :

- de la diversité des prions circulant chez les animaux de rente,
- et de leur capacité à franchir les barrières de transmission limitant leur propagation entre différentes espèces animales.

En l'absence de modèles *in vitro* ou *ex vivo* performants, l'utilisation de souris transgéniques exprimant une protéine prion hétérologue est la seule alternative pertinente à l'utilisation des espèces cibles (bovins, ovins, caprins) pour l'évaluation de la perméabilité des barrières d'espèces. De la même manière, seuls les modèles de souris transgéniques exprimant les différents variant du gène PRNP humain permettent d'évaluer le potentiel zoonotique des prions.

Dans un projet précédent, mené en collaboration avec 6 équipes Européennes, les propriétés biologiques d'un large panel d'isolats de prions (n=18) provenant d'ovins, de caprins et bovins ont été biologiquement caractérisées. De même, 15 isolats humains de maladie de Creutzfeld-Jakob, représentant les différentes formes clinico-pathologiques de la maladie (formes sporadiques, iatrogènes et nouveau variant) ont été caractérisés par bio-essais sur des souris transgéniques exprimant les principaux variant de la protéine prion humaine (M129M, V129V, M129V, E200K, D178N, A117V).

Dans ce nouveau projet, les objectifs sont :

- de transmettre (second et troisième passages) le panel d'isolats de prions humains et animaux, afin d'en stabiliser les propriétés biologiques ou de confirmer, le cas échéant, une absence de transmission (réplication à bas bruit de l'agent infectieux sans survenue d'une maladie clinique au cours de la durée de vie de la souris),
- d'évaluer la perméabilité de la barrière de transmission humaine aux prions animaux, et, en cas de transmission, de comparer leur phénotype avec ceux des isolats de maladie de Creutzfeld-Jakob.

Ces travaux devraient permettre de statuer sur le risque zoonotique que représentent les principales souches de prions circulant chez les animaux de rente et, le cas échéant, de confirmer un potentiel lien phylogénétique entre ces prions et ceux responsables de maladies humaines. Ils vont nécessiter 2808 souris transgéniques sur une période de 5 ans, qui seront inoculées par voie intracérébrale sous anesthésie, avec différents isolats de prions humains et animaux. Ces animaux seront élevés en cages teintées collectives de 6 souris (nombre minimal requis pour établir un phénotype fiable de chaque isolat et pour pouvoir comparer les durées d'incubation à l'aide de tests statistiques non paramétriques) équipées avec des bûchettes en bois à ronger et du coton pour la confection de nids. Ils seront surveillés quotidiennement jusqu'à l'apparition d'éventuels signes cliniques d'une maladie à prions

(maximum 650 jours). Dès la survenue de signes cliniques d'une encéphalopathie spongiforme, ou de toute autre maladie intercurrente, ou bien au-delà de 650 jours, les animaux seront euthanasiés et des prélèvements post-mortem seront effectués pour analyses biochimiques et histologiques.

6029. Au cours des dernières décennies, mais surtout depuis février 2013, la réglementation sur l'expérimentation animale a énormément évolué du point de vue éthique. Ainsi, les laboratoires ont l'obligation de prendre en considération la douleur potentiellement infligée à l'animal et de la soulager lors de leurs expérimentations tout en garantissant l'obtention de résultats scientifiques robustes.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact d'un traitement contre la douleur, obligatoire pour toute intervention chirurgicale, sur la prise de greffe et la croissance tumorale. Plusieurs familles d'analgésiques vont être évaluées : deux anti-inflammatoires non stéroïdiens et un dérivé morphinique, selon des posologies différentes. 4 types tumoraux humains vont être implantés chez la souris immunodéficiente. Pour évaluer les effets des molécules analgésiques testées, nous suivrons les perturbations de la prise de greffe et de la croissance tumorale des différents groupes pendant 1 à 2 mois.

Une étude bibliographique a permis de sélectionner différents types de tumeurs et d'antidouleurs les plus pertinents pour notre étude. Les processus inflammatoires impliqués dans la douleur consécutive à l'implantation tumorale sont la conséquence de mécanismes complexes qui ne peuvent être reproduits que sur un organisme entier. Les méthodes alternatives ne permettent pas de décrire ces processus, il est donc nécessaire d'étudier les effets des antidouleurs sur l'animal entier.

Afin de limiter le nombre d'animaux, les tumeurs vont être greffées sur chaque flanc de la souris. Le nombre d'animaux a été déterminé grâce à une étude statistique permettant une interprétation précise et significative des résultats obtenus. Les techniques de greffe ont été standardisées pour améliorer la reproductibilité des résultats.

Nous utiliserons un total de 640 souris.

Enfin, de manière à assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude, nous prendrons les dispositions nécessaires en vue de réduire et d'éviter toute forme de souffrance.

L'hébergement des animaux se fera dans des conditions optimales avec enrichissement du milieu et un suivi quotidien. Toutes les interventions et administrations se feront sous anesthésie générale ou locale. Du fait de l'objet du projet, seuls certains animaux recevront des antalgiques. Néanmoins, ils seront tous en groupes sociaux, bénéficiant d'enrichissement environnemental et les points limites seront strictement appliqués.

6030. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Environ 80% des AVC sont dits ischémiques, c'est-à-dire induits par une interruption de la perfusion sanguine cérébrale. La majorité des AVC ischémiques est liée à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot (thrombus) transporté par la circulation sanguine jusqu'aux artères cérébrales (embolie cérébrale). Cette occlusion empêche ainsi l'apport en oxygène dans les territoires irrigués par cette artère.

Actuellement un moyen de rétablir l'oxygénation des tissus est de rétablir la circulation sanguine des structures ischémiques (reperfusion du tissu cérébral). Ceci peut être réalisé pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Alteplase) est le seul médicament thrombolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aiguë de l'AVC ischémique thromboembolique. Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique. De plus, son efficacité est limitée : chez environ 50 % des patients, l'administration du traitement ne permet pas le rétablissement de la vascularisation (recanalisation) des artères obstruées.

Ce travail se situe dans le cadre plus général de la recherche de nouvelles thérapeutiques dans le traitement pharmacologique de l'AVC thromboembolique. Notre promoteur souhaite tester les effets d'un transporteur d'oxygène qui pourrait assurer le maintien de l'apport en oxygène lors de l'ischémie cérébrale. En effet la taille réduite du transporteur d'oxygène par rapport aux globules rouges, cellules transportant l'oxygène, ce composé pourrait franchir le caillot sanguin (thrombus) et suppléer rapidement l'apport en oxygène dans les territoires cérébraux ischémisés. Cette stratégie thérapeutique sera combinée à un traitement thrombolytique permettant la destruction (lyse) progressive du thrombus utilisant du rt-PA.

L'évaluation d'une telle molécule *in silico* ou *in vitro* ne permettrait pas de prédire l'efficacité du traitement dans le cadre d'une intervention visant à limiter la taille des lésions cérébrales au cours d'un AVC thrombo-embolique chez l'Homme. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeu au cours de l'ischémie-reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisables par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez le Rat (remplacement).

Au total, 156 rats mâles Wistar adultes de 300 à 400g seront utilisés pour ce projet. Sur la base de notre expérience du modèle, le nombre de rat utilisé pour cette étude sera réduit au minimum (réduction) garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats.

Chaque rat sera soumis à 4 procédures : tout d'abord à un prélèvement de sang de 0,4 ml à une des veines de la queue pour préparer des caillots ou thrombi (P1), puis l'induction sous anesthésie par voie gazeuse de l'AVC par injection de thrombi de taille calibrée au niveau de l'artère carotide en direction du cerveau (P2), et la mise en place d'un accès au niveau des veines de la queue pour l'administration des traitements (P3). Ces traitements seront effectués sur animaux vigiles par voie intraveineuse (P3) ; le produit testé sera administré 45 min après l'induction de la thrombo-embolie puis l'administration du rt-PA sera réalisée 2 heures après l'induction pour une partie initiale du traitement (bolus) puis du restant du traitement par perfusion pendant 1 heure.

Des tests neurologiques sensorimoteurs seront effectués 24 et 48 heures après induction de l'AVC en plaçant les animaux un par un dans un dispositif expérimental (espace de 60x40cm avec mur de 20 cm) pendant 10 minutes environ, dans une pièce attenante à l'animalerie, afin d'évaluer les déficits neurologiques.

Une surveillance soutenue des animaux sera réalisée au cours des 48 heures. Tout animal présentant une crise de convulsion supérieure à 5 minutes ou une incapacité à se déplacer avec une perte complète des réflexes posturaux à 24 heures sera mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

Les animaux seront placés à 2 ou 3 par cage à leur arrivée puis en cage individuelle à partir de l'induction de l'AVC jusqu'à leur mise à mort afin de faciliter leur récupération de la chirurgie, de leur administrer les traitements et de les surveiller. Les animaux disposeront d'une feuille de papier absorbant dans leur cage comme enrichissement (raffinement).

6031. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. L'ischémie du myocarde est une pathologie cardiovasculaire très répandue qui est à l'origine de dysfonctions vasculaire et cardiaque (arythmies et infarctus du myocarde).

L'infarctus du myocarde touche 120 000 personnes par an en France et provoque le décès de 50 millions d'Hommes chaque année dans le monde. Cette pathologie qui survient à la suite de l'obstruction d'une artère coronaire privant ainsi une partie du myocarde d'oxygène, entraîne à long terme une dysfonction du ventricule gauche du cœur qui aboutit à l'instauration de l'insuffisance cardiaque. La fatigue, les difficultés respiratoires et la dysfonction ventriculaire qui en résultent, sont encore mal prises en charge par les traitements actuels et nécessitent donc la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Cette situation clinique peut être étudiée au laboratoire grâce à des modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. L'ischémie du myocarde et l'insuffisance cardiaque fonctionnelle qui en découlent, sont des processus intégrés et complexes qui ne sont pas modélisables *in vitro* et ne peuvent être étudiées que sur des modèles animaux développés spécifiquement pour mimer les pathologies humaines. La sténose coronaire permanente ou transitoire (obstruction de l'artère coronaire) induite par chirurgie chez le rongeur fournit un modèle expérimental pertinent pour l'étude de l'infarctus du myocarde *in vivo* mais également du développement de l'insuffisance cardiaque consécutive.

Sur 5 ans ce projet prévoit l'utilisation au maximum de 6525 rats.

La chirurgie nécessaire à la sténose coronaire et à l'induction de l'infarctus est réalisée sous anesthésie et est couverte par une analgésie pré et post-opératoire. La fonction cardiaque et l'évolution de l'insuffisance cardiaque sont ensuite suivies par des méthodes non invasives et indolores, comme l'échocardiographie. Elles sont de plus réalisées sous anesthésie gazeuse afin de limiter le stress. La mesure des paramètres hémodynamiques (pression artérielle, fréquence cardiaque) est également réalisée sous anesthésie en fin d'expérimentation.

Ces examens visent à évaluer finement les effets d'un candidat médicament via un suivi longitudinal (dans le temps) par individu et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés.

Certains rats pourront également être utilisés dans le cadre d'une collaboration avec une seconde équipe d'un autre établissement utilisateur afin d'effectuer des évaluations de la fonction cardiaque par imagerie IRM.

Ces modèles d'insuffisance cardiaque vont également être pour certains destinés à des analyses *in vitro* après prélèvement des organes d'intérêt pour des évaluations histologiques, biochimiques, électrophysiologiques, etc...

Chez l'homme l'insuffisance cardiaque, peut être aggravée par différents facteurs de risques dits de co-morbidités tels que l'hypertension, le diabète ou encore l'obésité. Différentes souches de rats, présentant spontanément un ou plusieurs de ces facteurs de risques sont disponibles et peuvent ainsi être utilisées pour développer ce modèle, selon les besoins de recherche, afin de reproduire au plus juste les contextes d'insuffisances cardiaques retrouvés chez les patients. Ces études s'inscrivent en fin de processus de recherche de nouveaux candidats médicaments, à savoir que seuls seront étudiés dans ce projet des candidats médicaments préalablement sélectionnés pour leur efficacité sur des tests *in vitro*, et dont la pharmaco-sécurité chez le rat est avérée. Dans ces conditions, un suivi quotidien de l'état général des animaux est assuré conjointement entre les équipes de zootechnie et les expérimentateurs. Les rongeurs bénéficient d'un hébergement standard (avant chirurgie les animaux sont hébergés en groupe) ainsi que d'un enrichissement du milieu comme des bâtonnets à ronger. Dans certaines conditions expérimentales (récupération post chirurgicale, mesure de la pression par télémétrie, administration d'un traitement dans la nourriture ou dans l'eau de boisson, etc.) l'animal est placé seul dans une cage individuelle. Enfin tout animal présentant au moins un des signes constituant les points limites prédéfinis est immédiatement retiré de l'étude.

6032. Le traitement de nombreux cancers reste encore très difficile voire inefficace et les méthodes traditionnelles n'ont pas encore apporté de réponses satisfaisantes sur le long terme. Ainsi, souvent, après plusieurs chimiothérapies qui pour la plupart apportent un bénéfice immédiat, la tumeur va recommencer à croître, avec la sélection de cellules résistantes au traitement et aboutissant à la mort du patient. C'est pourquoi s'est imposée, au sein de la communauté scientifique, l'idée qu'une seule méthode de traitement n'est pas suffisante pour guérir du cancer. Il existe ainsi une demande pressante de la part de l'industrie pharmaceutique pour l'identification de récepteurs spécifiques des cellules tumorales, permettant des approches de ciblage ou vectorisation d'agents d'imagerie et molécules thérapeutiques. Des partenaires de ce projet ont engagé le développement de peptides vecteurs (pVectors) conjugués avec des molécules d'imagerie, soit des fluorochromes (pVectors FI), soit des agents cagés pour l'imagerie avec des radioéléments (pVectors-X). Certains de nos pVectors ont également été conjugués à un cytostatique (pVectors-CS) comme potentiels candidat-médicaments, susceptibles d'induire un blocage de la prolifération tumorale puis une diminution et une élimination de la tumeur. Nous poursuivons donc 2 objectifs scientifiques et technologiques principaux: i) le développement de nouveaux candidats-imagerie afin d'améliorer la détection et le suivi des cancers, ii) amener des candidats-médicaments aux phases

précliniques de validation. Les objectifs principaux concernant le 1er point se déclinent en 3 procédures spécifiques dans notre projet.

Des expériences sont ainsi envisagées chez l'animal (souris) pour les 3 procédures suivantes : 1) Glioblastomes, 2) Cancer pancréatique et 3) Cancer des Glandes Surrénales.

Lors de précédentes études *in vitro*, nous avons pu démontrer le ciblage spécifique d'une première génération de vecteurs d'imagerie sur différents modèles cellulaires. Dans le présent projet, nous souhaitons utiliser ces mêmes vecteurs et des vecteurs optimisés (peptides différents, linkers différents) afin d'évaluer le potentiel de ciblage *in vivo*. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les protocoles expérimentaux. Nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives *in vitro*. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier la distribution de nos molécules d'imagerie dans des systèmes *in vitro* reproduisant la complexité des systèmes vivo (élimination, stabilité). Le modèle rongeur est indispensable à notre étude car il facilite le suivi des expérimentations, la gestion de la douleur, la faisabilité d'un groupe et le modèle de choix pour la préclinique. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux nécessaire (300 animaux) pour cette étude « Approche Imagerie », d'une durée totale de 5 ans, a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à des données de la littérature, et à des études précédemment réalisées dans le cadre de projet semblables concernant le développement de radiotraceurs pour TEP. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences (une moyenne de 60 animaux par an, soit un nombre total et maximal de 300 animaux sur 5 ans avec une répartition d'environ 100 souris par type de cancer). L'ensemble de ces paramètres sera affiné en fonction des premiers résultats obtenus afin d'ajuster au mieux le nombre d'individus nécessaires par étude et si possible réduire cette estimation.

Dès leur arrivée les animaux seront placés en salle de transgénèse pendant une semaine avant toute expérimentation. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en cartons et des petites maisons y seront disposées, hébergement en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites (état général, perte de poids, volume de la tumeur...) permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Des soins pré et post opératoires seront effectués lors de chaque expérimentation avec recours à l'anesthésie et analgésie lorsque cela sera nécessaire. Le personnel impliqué dans ce projet assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. La Réduction du nombre d'animaux passe par une étude longitudinale qui utilise les mêmes animaux pour l'injection des molécules contrôle/d'intérêt sur les différents temps du protocole (l'animal imagé est son propre témoin).

6033. 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 Pharmacologie chez le cobaye 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 cobaye 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 50 animaux. Le nombre d'animaux utilisés s'explique par la quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Les dommages sont inhérents aux études précliniques, qui consistent à administrer des 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. 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 animaux seront hébergés sur litière de cellulose et leur environnement sera enrichi : mise à disposition d'un bâton à ronger et de foin. Les animaux seront également socialisés (excepté durant les périodes d'enregistrement de télémétrie). Ils 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. L'objectif de ce projet est de réaliser les études de télémétrie qui sont des prérequis réglementaires non-cliniques permettant d'initier des études cliniques et/ou de demander une Autorisation de Mise sur le Marché.

Les animaux sont équipés par chirurgie d'un implant de télémétrie permettant l'enregistrement télémétrique de différents paramètres physiologiques puis recevront plusieurs administrations du composé à tester à des doses différentes. En fin de projet, les animaux seront euthanasiés ou remis en zone d'hébergement hors étude en vue d'une possible réutilisation ultérieure.

6034. 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 Pharmacologie chez le rongeur 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 rongeur 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 11280 animaux. Le nombre important d'animaux utilisé s'explique par la grande quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Le rongeur est une espèce homogène d'un point de vue des conditions d'hébergement. Nous nous engageons à socialiser au mieux les animaux lorsque la situation le permet, en effet les rats sont socialisés ainsi que les souris femelles, mais les souris mâles sont isolées pour cause de bagarres entre eux. Un programme d'enrichissement est mis en pratique, du papier kraft ou encore du bois à ronger est mis à la disposition des animaux. Les études précliniques consistent à administrer des 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 nous socialiserons les animaux lorsqu'il le sera possible. Les techniques pouvant engendrer du stress 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. Ils sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet. Ils 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.

6035. 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 chez le rongeur 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. Dans les études précliniques une étude rongeur et une étude non rongeur est nécessaire. 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 78500 animaux. Le nombre important d'animaux utilisé s'explique par la grande quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Le rongeur est une espèce homogène d'un point de vue des conditions d'hébergement. Nous nous engageons à socialiser au mieux les animaux lorsque la situation le permet, en effet les rats sont socialisés ainsi que les souris femelles, mais les souris mâles sont isolées pour cause de bagarres entre eux. Un programme d'enrichissement est mis en pratique, du papier kraft ou encore du bois à ronger est mis à la disposition des animaux. Les études précliniques consistent à administrer des 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 nous socialiserons les animaux lorsqu'il le sera possible. Les techniques susceptibles d'engendrer du stress 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. Ils sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet. Ils 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.

6036. Les ribosomes assurent l'intégralité de la synthèse des protéines dans chaque cellule de l'organisme. La synthèse de ces ribosomes est donc un processus fondamental, universel et finement contrôlé. De nombreuses études en culture cellulaire ont mis en évidence un lien robuste entre la synthèse des ribosomes et la formation de tumeurs. En particulier, l'inhibition de la synthèse des ribosomes à l'aide de molécules chimiques provoque l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs. Cette approche, testée à ce jour essentiellement *in vitro*, semble prometteuse mais doit encore être validée dans des systèmes physiologiquement pertinents.

Le but de cette étude est d'évaluer *in vivo* l'impact de l'inhibition de la synthèse des ribosomes sur l'état de santé de souris dont l'épithélium intestinal est en cours d'initiation tumorale. Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques dans lesquelles des gènes impliqués dans la tumorigénèse ou dans la synthèse des ribosomes peuvent être inactivés simultanément dans l'épithélium intestinal, afin d'évaluer les conséquences des altérations de la production des ribosomes sur la tumorigénèse.

Cette étude a un double objectif :

1) Tester l'efficacité d'une stratégie thérapeutique *in vivo*, ce qui implique d'évaluer le bénéfice réel de cette stratégie pour la santé de l'individu, et rend donc le recours à l'animal nécessaire.

2) Déterminer des points limites pertinents pour être en mesure d'étudier l'effet de l'inhibition de la synthèse des ribosomes sur la tumorigénèse à l'échelle cellulaire et moléculaire au moyen de procédures plus complexes tout en garantissant une souffrance minimale pour les souris soumises à ces procédures.

Sur une période de 2 ans, nous prévoyons l'utilisation de 24 souris adultes (7 semaines sans distinction de sexe) dans une procédure de classe modérée. Le nombre de souris utilisé est basé sur un plan expérimental stéréotypé permettant d'obtenir la puissance statistique nécessaire à l'obtention de conclusions biologiquement pertinentes. Le modèle murin étudié étant un modèle d'initiation tumorale, et l'objectif de l'étude étant d'évaluer l'effet d'un traitement sur la survie, la procédure mise en œuvre occasionnera aux animaux une perte de poids liée à la prolifération de cellules pré-cancéreuses dans l'intestin. Au moyen de vérifications quotidiennes, nous garantissons que l'expérience sera immédiatement interrompue sur chaque souris présentant des signes cliniques de souffrance.

6037. Les pathologies cardiovasculaires –en particulier l'infarctus du myocarde (IM) - représentent la principale cause de mortalité à ce jour. L'IM est la conséquence de l'obstruction des artères coronaires. Celle-ci conduit à une ischémie tissulaire qui induit une mort des cellules contractiles du cœur, les cardiomyocytes, puis à une insuffisance cardiaque.

La réponse inflammatoire associée à l'IM joue un rôle majeur dans le contrôle de la fonction cardiaque et implique de nombreuses cellules communiquant entre elles. Récemment les vésicules extracellulaires (VEs) ont été décrites comme un nouveau mode de communication.

Notre projet a pour but d'étudier, chez la souris, le rôle de ces vésicules extracellulaires (VEs) d'origine cardiaque susceptibles d'agir comme des messagers intercellulaires lors de l'infarctus du myocarde. Pour cela, nous évaluerons 1- quelles cellules captent les VEs localement et à distance et 2- quel est l'effet d'un tel transfert.

La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le processus inflammatoire associé à l'infarctus du myocarde. L'analyse consistera à étudier la réponse inflammatoire en fonction du temps ainsi que l'étude de la fonction cardiaque et du remodelage associé par échocardiographie. Cette étude est prévue sur 5 ans et nécessitera au total 3300 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. En effet, nos données *in vitro* nous ont déjà permis d'identifier certaines des cellules réceptrices. De plus des paramètres expérimentaux tels que le nombre d'animaux ou bien encore les durées de traitements ont déjà été déterminés par d'autres projets nous permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures se feront sous anesthésie générale et des traitements antalgiques sont prévus. Nous avons établi une grille d'évaluation des points limites, si ces paramètres sont atteints, une mise à mort anticipée des animaux sera réalisée.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes impliquant les vésicules extracellulaires dans le contrôle de l'inflammation associée à l'infarctus du myocarde. Ces résultats pourraient permettre d'envisager dans le futur le développement de nouvelles thérapies.

6038. Les systèmes d'élevage de ruminants doivent dorénavant réduire l'utilisation d'aliments concentrés et maximiser la ressource fourragère pour des raisons économiques, environnementales et sociétales. Dans ce contexte, la durabilité des systèmes d'élevage d'herbivores repose sur la capacité des animaux à utiliser plus efficacement un éventail d'aliments, disponibles non seulement au niveau de la ferme mais aussi à l'échelle des territoires et sur l'aptitude biologique à faire face aux variations qualitatives et quantitatives (naturelles ou induites) des ressources alimentaires. Ainsi, le bilan nutritionnel (apports – besoins) de l'animal peut se trouver négatif à certains stades physiologiques et périodes d'une année de production. Des animaux robustes, c'est-à-dire capables d'assurer une gestion autonome (en limitant l'intervention de l'homme) du rapport entre les ressources disponibles et leurs besoins, sont donc recherchés. A ce jour les capacités d'adaptation des herbivores d'élevage vis-à-vis de ces contraintes nutritionnelles n'ont pas été favorisées et leur déterminisme reste encore mal connu. La capacité des animaux à utiliser leurs réserves lipidiques corporelles face à des besoins nutritionnels élevés et/ou des restrictions alimentaires, et à constituer des réserves corporelles en

période de besoins faibles et/ou d'abondance alimentaire est un des mécanismes clés d'une telle capacité d'adaptation ou de robustesse individuelle.

Les objectifs du projet sont de comprendre les mécanismes biologiques majeurs et le déterminisme génétique, encore mal connus, qui contrôlent la capacité des animaux à utiliser/constituer des réserves corporelles lipidiques au cours d'un cycle de production (mise à la reproduction/gestation/mise-bas/élevage et sevrage des agneaux). Cette meilleure connaissance (biologique et génétique) à l'échelle individuelle permettra d'élaborer et de proposer aux éleveurs des stratégies de conduite de l'alimentation et de sélection génétique des animaux pour renforcer la compétitivité et la durabilité des élevages de ruminants.

3 R :

- Remplacement :

La substitution de modèle animal n'est pas possible puisque nous souhaitons mesurer des aptitudes biologiques. L'utilisation d'animaux placés dans des conditions d'élevage de bergerie est indispensable pour mesurer la variabilité du caractère étudié, qui n'est pas connue dans aucune espèce animale à ce jour. Nous proposons de travailler avec l'espèce ovine, espèce de ruminants de petite taille, élevée à des fins commerciales dans des systèmes et des environnements très diversifiés et sollicitée pour la réduction d'utilisation d'intrants alimentaires et pour le renforcement d'utilisation des surfaces pastorales.

- Réduction :

Le nombre d'animaux retenu prend en compte la puissance statistique calculée à des fins d'analyse physiologique et génétique. 160 brebis sont nécessaires pour un suivi précis et fiable à long terme des profils métaboliques de brebis appartenant à deux lignées opposées pour l'efficacité alimentaire. Cet effectif complète un autre dispositif plus large pour permettre l'exploration génétique du caractère étudié qui impose un dimensionnement important pour garantir la représentativité de la variabilité génétique dans la race étudiée.

- Raffinement :

Les manipulations des animaux, supplémentaires à celles d'élevage, induites par ce projet, consisteront à des prélèvements sanguins (PS) répétés 5 et 6 fois, respectivement, pour la première et la deuxième année de production suivies. Aucun effet indésirable, de cette procédure, n'est attendu sur les animaux. Des paramètres biologiques sanguins seront mesurés pour évaluer l'état des réserves lipidiques de l'animal. Ces mesures d'état corporel seront mises en relation avec l'ingestion individuelle mesurée par ailleurs. Les animaux seront visités quotidiennement.

En cas de symptôme inquiétant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire.

En dehors de la procédure expérimentale, l'ensemble des brebis sera conduit au sein du troupeau dans les conditions d'élevage classiques de l'établissement utilisateur : les animaux seront hébergés en groupe, de manière à exprimer leurs comportements sociaux, avec de la litière sur paille. Les brebis seront produites et élevées selon une conduite mixte de bergerie et pâturage.

En bergerie : des pneus suspendus régulièrement remplis de paille seront disposés dans les parcs.

6039. Dans la pratique médicale et chirurgicale actuelle, malgré les nombreuses innovations techniques, la reconstruction tissulaire "*ad integrum*" demeure un challenge.

Dans le cadre de la reconstruction mammaire, plusieurs traitements chirurgicaux peuvent être proposés, seuls ou combinés.

- La technique la plus répandue et connue est la prothèse en gel de silicone mais cette technique simple a pour principaux écueils d'implanter un corps étranger et d'imposer des changements d'implants itératifs tous les 10 ans environ.

- La reconstruction par un lambeau pédiculé ou libre pour reconstruire du volume à partir des tissus de la patiente est une méthode répandue mais elle n'est pas envisageable chez toute les patientes, elle consiste en plusieurs temps opératoires lourds et longs, et induit une comorbidité non négligeable du site donneur.

- L'alternative est le lipofilling qui consiste en un remplissage progressif des espaces vidés grâce à des cellules adipeuses provenant de la patiente. Bien que cette technique soit attractive (pas de séquelle du site donneur et même bénéfique secondaire par lipoaspiration), la survie cellulaire ne dépasse pas 70% à terme, suite probablement à un défaut de vascularisation. Ce procédé, devenu très courant, demeure une technique contraignante car elle nécessite dans la majorité des situations cliniques plusieurs temps opératoires.

L'objectif du projet est d'améliorer la méthode de lipofilling actuelle pour les transferts adipeux de gros volume (>200mL) en créant une structure transitoire associant tissu autologue et matière synthétique résorbable servant de support à la vascularisation. L'objectif est d'obtenir une reconstruction autologue, de volume suffisant, sans séquelle de site donneur et ne nécessitant qu'un seul temps opératoire.

Le regroupement des équipes de chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, de biologie cellulaire de la banque de tissus ainsi que d'une entreprise privée du textile collaborant a permis de proposer une structure mixte constituée d'une matrice synthétique résorbable constituée d'un dôme et d'un socle. Lors de l'intervention chirurgicale, dôme et socle sont assemblés autour du tissu adipeux de l'hôte, créant ainsi une "prothèse" qui deviendra physiologique après dégradation du matériau synthétique.

Après obtention de résultats satisfaisants sur le volume adipeux reconstruit *in vitro* puis *in vivo*, il est nécessaire de raffiner la structure synthétique en sélectionnant le matériau optimal.

Une étude de la littérature nous a permis de sélectionner 5 biomatériaux potentiellement adaptés eu égard de leur profil de bio-résorption.

Une étude *in vivo* est indispensable car elle seule permet de valider ces informations en les confrontant au milieu vivant et en prenant en compte l'architecture définitive de la prothèse.

Nous désirons donc réaliser une comparaison de la résorption de polymères (PGS, PDS et 3 copolymères PLGA de ratios différents) en intégrant les caractéristiques extrinsèques de forme, épaisseur et architecture de la prothèse *in vivo* sur modèle murin.

Nous avons établi un protocole en exploitant la règle des "3R" :

Le REMPLACEMENT du modèle animal est impossible car ne nous permet pas d'obtenir les informations de dégradation *in vivo* nécessaires.

La REDUCTION du nombre d'animaux est effective en diminuant au minimum les explantations afin d'obtenir des tracés suffisamment précis pour être exploitables et permettre la mise en évidence de différences entre les matériaux. Nous avons initialement pensé à implanter 2 prothèses de 2 biomatériaux différents sur un même rat mais dans la littérature, le facteur confondant induit un biais qui n'est pas acceptable.

Le RAFFINEMENT a été au cœur de l'élaboration du protocole avec notamment la détermination des points limites et l'optimisation de l'hébergement en lien avec le responsable du bien-être animal de l'établissement.

Notre protocole comprend 44 rats : 40 rats chez lesquels nous implantons 40 prothèses imprimées en 3D (8 rats pour chaque matériau étudié) et 4 rats témoins : 2 rats chez lesquels nous effectuons la dissection et la levée d'un lambeau mais sans mise en place de prothèse résorbable et 2 rats chez lesquels nous implantons des prothèses en gel de silicone de taille identique aux résorbables.

Conformément aux profils de résorption issus des fiches fabricant et de la littérature, nous souhaitons suivre les profils de résorption durant 20 semaines.

Nous réaliserons des explantations itératives après sacrifice aux semaines 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 et 20 en explantant à chaque étape 5 rats (1 rat = 1 prothèse = 1 matériau).

Chaque rat sera donc suivi sur une période durant de 2 à 20 semaines en fonction de la date à laquelle il sera sacrifié pour étude de résorption de la prothèse. Les rats témoins sont suivis 20 semaines.

Des tests spécifiques et non spécifiques ont été élaborés pour l'obtention des données nécessaires. Aucun test chez l'animal avant sacrifice n'est douloureux au sens réglementaire du terme, c'est à dire aucun geste aux répercussions supérieures à celles induites par une aiguille sous cutanée.

Le protocole nous permet de réaliser à mesure des profils de résorption et de diminution des propriétés mécaniques *in vivo* pour chaque matériau afin de choisir le matériau optimal en fonction de la durée nécessaire pour l'expansion tissulaire.

Il s'agit d'un projet susceptible d'apporter une innovation majeure dans l'arsenal thérapeutique actuel de la chirurgie plastique et reconstructrice et de changer la pratique à l'échelle mondiale.

6040. Les gliomes sont classés par l'organisation mondiale de la santé en fonction de leurs caractéristiques histopathologiques, et les gliomes de grade IV, aussi appelés glioblastomes (GBM), sont les tumeurs les plus malignes, agressives et fortement vascularisées. Les chances de survie des patients sont très faibles (moins de 5% dépassent 5 ans de survie) et aucun traitement curatif efficace n'a encore été identifié.

Les récentes recherches montrent que les altérations des cellules tumorales sont extrêmement complexes et variables ce qui rend difficile l'identification d'un traitement universel efficace ciblant directement la croissance tumorale. Une approche thérapeutique intéressante à explorer consisterait à cibler les cellules du microenvironnement de la tumeur car celles-ci sont génétiquement stables. Deux populations de cellules immunitaires nous intéressent particulièrement car elles sont impliquées dans la croissance tumorale et car elles sont présentes en grand nombre dans le microenvironnement : les cellules microgliales qui sont des cellules résidentes du cerveau et les monocytes circulants dans l'organisme qui sont recrutées au niveau de la tumeur.

Notre approche vise donc à étudier *in vivo* la réponse des cellules microgliales, des monocytes circulants ainsi que le comportement des neurones présents dans la région tumorale grâce à la combinaison de deux techniques originales :

- 1) l'utilisation de souris génétiquement modifiées afin d'obtenir un marquage fluorescent pour les trois types des cellules étudiées (à savoir les neurones, les cellules microgliales et les monocytes circulants) ;
- 2) l'imagerie intra vitale bi photonique (6 couleurs), une approche unique pour étudier avec une résolution cellulaire, *in vivo*, l'évolution de la tumeur dans son environnement cérébral.

En utilisant cette approche notre premier objectif est d'acquérir une meilleure connaissance de la composition cellulaire et des changements dynamiques du microenvironnement de la tumeur. Notre second objectif est d'étudier l'effet et le mécanisme d'action de deux agents pharmacologiques prometteurs dans le traitement du GBM:

1) le bevacizumab, un médicament réduisant l'angiogenèse qui a déjà montré une activité thérapeutique intéressante pour la qualité de vie des patients atteints de GBM mais pour lequel on peut observer chez certains patients un échappement thérapeutique non expliqué ;

2) un nouveau candidat médicament dirigé contre une enzyme appelée la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) dont le niveau plasmatique est corrélé à la fois à la survie et à l'échappement thérapeutique des patients traités par bevacizumab.

Ce projet est conforme aux exigences des 3R:

-Remplacement: Ce projet est basé sur de solides études *in vitro*, qui nous permettent de savoir précisément où chercher et quoi chercher. Cependant, à ce stade des recherches, l'utilisation de modèles complexes, i.e. d'animaux vivants, est requise avant d'envisager une application clinique des agents pharmacologiques.

-Réduction: L'originalité de notre étude est de poser chirurgicalement une fenêtre cérébrale aux souris transgéniques afin de permettre l'étude longitudinale des animaux. Le nombre d'animaux nécessaires est ainsi réduit par rapport à une étude transversale. Seulement le nombre minimal de souris C57BL/6J nécessaire à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif sera utilisé (17 animaux par groupe expérimental soit 51 animaux). Le projet nécessitera en tout la naissance de 500 animaux parmi lesquels les 51 animaux triplement transgéniques seront soumis aux procédures expérimentales. Ces nombres seront réduits si des résultats extrêmement probants ou au contraire disqualifiant sont obtenus en cours du protocole expérimental.

-Raffinement: Toutes les mesures possibles permettant d'améliorer les conditions de vie des animaux sont prises. Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies avec du coton et des rouleaux de carton, avec un accès non-limité à la nourriture et l'eau. Les animaux sont vérifiés tous les jours, par des personnes compétentes dans le domaine de l'expérimentation animale.

6041. Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes du système immunitaire inné impliqués dans la défense anti-tumorale et antimicrobienne. Les NK détectent leurs cibles grâce à une reconnaissance directe de ligand microbien et non-microbien par des récepteurs activateurs exprimés à leur surface. La nature de ces ligands activateurs reste à identifier en particulier pour NKp46, un récepteur exprimé par toutes les cellules NK et très conservé chez les mammifères. Le rôle de ce récepteur et la réponse des cellules NK suite à l'engagement de ce récepteur sont peu connus. Nous avons récemment montré un nombre élevé d'infections bactériennes invasives incluant du sepsis chez des patients présentant une lymphopénie NK. Ces résultats nous ont amenés à investiguer le rôle des cellules NK lors d'infections bactériennes invasives. En collaboration avec un institut Français nous avons étudié le rôle des cellules NK dans un modèle d'infection par *Neisseria meningitidis* (Nm) chez la souris. Nm ou méningocoque, est une espèce bactérienne uniquement rencontrée chez l'homme et cette bactérie peut être responsable de méningites, de septicémie, d'arthrites et de péricardites septiques. Ces infections peuvent se compliquer de choc septique potentiellement mortel dans environ un tiers des cas. De ce fait, l'infection invasive à méningocoque constitue un défi à vaincre en matière d'urgence en pathologie infectieuse. Nous étudions une maladie strictement humaine, pour laquelle les modèles animaux exploitables sont limités. Le modèle murin est un modèle de choix de par l'existence de souris génétiquement modifiées et dont le système immunitaire est proche de celui de l'homme. Dans notre cas, le récepteur NKp46 des cellules NK est très conservé entre l'homme et la souris. La souris est de plus un bon modèle d'étude du sepsis induit par Nm. Nos données collaboratives ont déjà permis de montrer une implication des cellules NK et de NKp46 pour le contrôle de cette infection *in vivo*. Nous planifions maintenant de conforter et d'approfondir ces données. Nous projetons d'utiliser des souris commerciales ainsi que des souris transgéniques déficientes pour le récepteur NKp46 exprimé par les cellules NK. Ces modèles doivent permettre de réaliser des études *in vivo* afin d'explorer des stratégies thérapeutiques et de protection contre le méningocoque. Nous prévoyons également d'administrer aux animaux non génétiquement modifiés des anticorps permettant l'élimination des cellules NK avant infection. Enfin, nous prévoyons d'appliquer un protocole de délivrance de facteur P recombinant aux souris infectées, protocole publié dans la littérature comme permettant de soigner les animaux. Pour les 12 mois de ce projet, nous utiliserons 120 souris dans 2 procédures sévères et une procédure de sévérité modérée. L'utilisation du méningocoque nécessite une vaccination préventive du personnel utilisateur des locaux expérimentaux. Afin d'éviter une vaccination massive des agents utilisateurs de ces structures, les expérimentations seront réalisées dans la plateforme A3/L3. Les animaux seront hébergés en isolateur deux semaines (une semaine d'acclimatation suivie de la semaine d'expérimentation) avec un environnement enrichi (dôme et matériel de nidification). Les effectifs d'animaux nécessaires ont été calculés au plus juste pour les besoins du projet selon la règle des 3R, sur la base de tests statistiques de rang non paramétrique et en tenant compte de notre expérience. Ces procédures expérimentales visent à étudier la réponse immunitaire lors d'une infection par un agent pathogène. Les analgésiques ayant un effet immun modulateur ne peuvent être utilisés sans compromettre les résultats expérimentaux. L'état général des animaux sera suivi régulièrement pour détecter précocement des signes de douleur ou de mal-être afin de pouvoir intervenir dans les plus brefs délais. Plus particulièrement nous serons attentifs à la posture (opisthotonos), l'état du pelage (souillure), aux blessures (automutilation), aux écoulements. Une souris qui aura perdu 20% de son poids initial sera systématiquement euthanasiée. Une table des scores sera utilisée pour chaque animal nous permettant d'ajuster les paramètres d'observation ainsi que l'arrêt de l'expérimentation si nécessaire.

6042. Malgré des progrès dans le traitement de nombreux cancers, les résistances à certains agents thérapeutiques, les rechutes ou l'absence de traitements efficaces dans certains cas font que les cancers au sens large sont encore un problème majeur de santé publique nécessitant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, le développement et l'amélioration des techniques de production/modification d'anticorps permettant aujourd'hui d'obtenir de manière rapide et efficace des anticorps de spécificités souhaitées laissent entrevoir de réels espoirs. En effet, l'utilisation seule ou en combinaison avec des traitements déjà existants, de nouveaux anticorps à visée thérapeutique a déjà été couronnée de succès cliniques importants ou très prometteurs (Herceptin, Adcetris, Ipilimumab, Nivolumab), ce qui en fait une stratégie efficace de choix et en plein essor, notamment dans la lutte contre le cancer.

Le projet faisant l'objet de la présente demande s'inscrit dans ce cadre, à savoir qu'il a pour objectif de pouvoir faciliter et accélérer le transfert de la recherche fondamentale ou industrielle vers la clinique en permettant de tester les effets thérapeutiques anti-tumoraux potentiels d'anticorps candidats médicaments *in vivo* chez la souris.

Il consiste au développement et à l'utilisation dans notre animalerie de modèles précliniques de greffes de cellules tumorales chez la souris, dans le respect de la règle des « 3R ». Ces modèles murins sont indispensables pour permettre l'évaluation de l'effet thérapeutique anti-tumoral, de la toxicité et du devenir chez l'animal des anticorps candidats médicament. Ils constituent une première étape essentielle et incontournable avant le transfert vers la clinique de candidats médicament. Ils sont largement décrits dans la littérature et ne peuvent aujourd'hui être remplacés à ce stade des études précliniques par aucune autre méthode satisfaisante. De ce fait, les mesures permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, leur souffrance et leur angoisse seront prises, comme par exemple:

-Ne seront injectés aux souris que les « couples » cellules cancéreuses / anticorps pour lesquels un effet des anticorps aura été observé *in vitro*.

-Le nombre d'animaux nécessaires par lot par expérience sera calculé en se basant à la fois sur les données de la littérature, des expériences « pilotes » et un test statistique de puissance. Dans ces conditions, pour les 5 ans du projet, le nombre maximum estimé d'animaux utilisés est de 29 720.

-Le suivi du développement des pathologies et/ou de l'effet des anticorps testés sera évalué au cours du temps par des méthodes non invasives.

-Dès qu'un animal atteindra un des points limites définis, il sera mis à mort selon la méthode recommandée.  
-Les animaux seront hébergés dans des cages avec de l'enrichissement et adaptées pour contenir 5 individus et ainsi minimiser le stress de l'isolement.

6043. Les tumeurs gastro-intestinales sont fréquentes dans la société moderne et de nombreuses technologies ont été développées pour localiser, identifier et traiter ces tumeurs. La détection et la résection précoces restent la clé de la survie à long terme et offrent un pronostic de guérison globalement très favorable. La détection des tumeurs à un stade de développement précoce permet de proposer des résections ciblées qui préservent l'anatomie et la physiologie des organes concernés. La technique de dissection sous-muqueuse endoscopique (ESD) des tumeurs gastro-intestinales superficielles, décrite il y a près de 20 ans pour la résection des tumeurs superficielles de l'estomac, est largement utilisée car elle fournit des taux élevés de résection complètes et curatives. Dans les pays asiatiques, où l'incidence de cancers gastriques est très élevée, l'ESD est devenue la norme thérapeutique pour le cancer gastrique précoce. Toutefois, l'ESD est une procédure techniquement difficile dans laquelle le taux de complications et le temps opératoire dépendent largement de l'expérience de l'opérateur, de la localisation et de la taille de la lésion. Plus récemment elle a été proposée pour la résection des tumeurs précoces colorectales mais elle s'est avérée encore plus difficile, en raison de caractéristiques anatomiques spécifiques (parois fines, mouvements péristaltiques, plis de la muqueuse) et présente un risque plus élevé de complications comme les perforations. L'expérience des opérateurs asiatiques en ESD gastrique leur a permis de réaliser l'ESD colorectale avec un taux de succès plus favorable et un taux de complications moins élevé que pour les opérateurs du monde occidental qui n'ont que peu d'expérience préalable avec le cancer de l'estomac.

L'ESD est réalisée avec un endoscope flexible (gastroscope, colonoscope) qui est à la base un instrument de diagnostic et n'avait pas été conçu pour réaliser des gestes thérapeutiques. Cela explique la complexité technique de l'ESD et l'importance de l'expérience de l'opérateur. D'un point de vue chirurgical, les limites les plus évidentes pour un geste de résection dans la lumière du tube digestif sont l'absence de rétraction efficace des tissus, de vues claires et stables et de triangulation des instruments, qui sont des éléments fondamentaux d'une chirurgie efficace et sûre. Pour pallier à ces limitations, un endoscope flexible « chirurgical » a été développé dans notre institution. Cet instrument a la particularité d'utiliser des instruments flexibles et articulables de large calibre introduits dans les canaux opérateurs et permettant d'obtenir une triangulation et une rétraction « chirurgicales ». Il est manipulé par deux opérateurs, l'un pour le positionnement de l'endoscope, l'autre pour la manipulation des instruments articulables. Cet appareil a été utilisé avec succès dans de nombreuses procédures expérimentales et dans des applications cliniques après obtention d'un marquage CE. Une étude expérimentale a notamment comparé ses performances à la technique classique avec un endoscope traditionnel dans l'ESD de modèles de tumeurs colorectales chez l'animal. Le temps opératoire et le taux de perforations coliques étaient significativement en faveur cet appareil opéré par un novice confronté à un opérateur expérimenté en endoscopie flexible.

Afin d'améliorer son ergonomie et ses performances l'étape suivante a été d'en développer une version « robotisée », dans le même esprit que le robot chirurgical Da Vinci qui a permis de faciliter certains gestes chirurgicaux. Cette plate-forme expérimentale a été testée également dans de nombreuses procédures *ex-vivo* et *in-vivo*, notamment pour l'ESD colorectale. L'efficacité et les performances ont été confirmées et ont conduit à la décision de passer de la phase de prototypage à une phase industrielle préclinique. Le software et le hardware ont été repensés dans cette optique et une seconde génération a été produite et fait l'objet de cette étude de validation préclinique.

Le but de l'étude est d'évaluer les performances de la seconde génération de la plateforme endoscopique robotisée, en termes de sécurité et d'efficacité lors de la réalisation d'ESD de tumeurs colorectales simulées dans un modèle animal sans survie postopératoire.

Le projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Pour tester la sécurité et l'efficacité (temps de procédure, complications) de la plateforme STRAS en phase préclinique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser des dispositifs chirurgicaux conçus pour un usage chez l'homme, et par son anatomie, notamment colorectale distale, qui présente des caractéristiques tissulaires parfaitement comparables à l'homme

Réduction : le fait que l'étude n'est pas comparative, que les résultats obtenus lors des expérimentations précédentes avec la plateforme endoscopique mécanique (0% de perforations coliques- courbe d'apprentissage rapide) et que 3 ESD/sujet sont planifiées, permet réduire au maximum le nombre de sujets d'expérimentation tout en permettant d'obtenir des résultats significatifs. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles techniques chirurgicales, nous estimons que 10 animaux représentent un nombre nécessaire et suffisant.

Raffinement : le projet prévoit des procédures endoscopiques réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle de la douleur postopératoire, sans étude de la survie, et dès lors ne nécessite pas de mesures particulières en postopératoire.

6044. La tachycardie ventriculaire (VT) est un rythme cardiaque dangereusement rapide qui réduit la capacité de pompage des principales cavités cardiaques, les ventricules, et est la principale cause de mort subite cardiaque. La VT est traitable en utilisant la technologie « d'ablation », où la région cicatricielle anormale du muscle cardiaque est détruite par une procédure minimalement invasive utilisant un cathéter délivrant une énergie de radiofréquence. Les taux de réussite de la procédure sont actuellement d'environ 50%, et les patients vont encore nécessiter l'implantation d'un défibrillateur (ICD), un dispositif coûteux qui choque le patient pour lui permettre de retrouver un rythme cardiaque normal. Cette étude vise à utiliser la technologie d'imagerie par résonance magnétique (MR) pour améliorer la précision de l'ablation de VT en permettant la visualisation directe de la cicatrice.

Objectifs de l'étude

1. Démontrer la fonctionnalité du système MR-EP, afin de permettre des essais humains ultérieurs

2. Évaluer l'exactitude et la fiabilité de la mesure des signaux électriques cardiaques, en utilisant des cathéters dans le cœur, sous guidage-MR
3. Évaluer la précision et l'efficacité des brûlures d'ablation effectuées dans un MR-scanner en utilisant le cathéter en développement
4. Évaluer l'exactitude de l'évaluation par MR de ces brûlures d'ablation. La MR sera comparée à des mesures histologiques
5. Quantification de l'efficacité de l'ablation de VT guidée par MR dans un modèle animal. Un sous-ensemble d'animaux sera testé pour VT avant l'ablation, puis réévaluée à 4-6 semaines après l'intervention

Un total de 53 porcs sera impliqué dans ces expériences. 25 porcs seront en bonne santé avant la procédure MR-EP (Phase zéro), et 28 porcs auront subi une procédure 4 à 6 semaines préalablement afin de créer un modèle animal de VT (Phase 1)

Cette étude a été conçue pour nécessiter un minimum absolu d'essai *in vivo*, une vaste validation *ex vivo* ayant déjà été effectuée. L'étude de phase zéro (25 porcs, aucune procédure préparatoire) sera utilisée pour vérifier la fonctionnalité complète du système et affiner à la fois l'imagerie et le suivi des performances avant les procédures sur les porcs avec modèle de VT. Le nombre de porcs est basé sur notre expérience préalable dans le développement du système d'ablation guidée par MR pour une utilisation dans les procédures d'ablation auriculaire.

La Phase 1 (28 porcs, modèle de cicatrice VT) visera à évaluer de multiples objectifs en une seule série d'expériences. Le design expérimental est intensif en termes de collecte de données et de défis techniques, mais permettra de minimiser le nombre de sujets. Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie générale. Pendant les périodes de rétablissement, on peut prévoir un certain degré de péricardite, une irritation de la muqueuse externe du cœur qui peut causer de l'inconfort. Cet inconfort répond bien aux médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens et sera administré à titre prophylactique lors des phases de récupération. Toutes les mesures appropriées seront prises pour minimiser les souffrances liées aux procédures, et l'euthanasie sera effectuée par anesthésie terminale.

6045. Parmi les pathologies inflammatoires chroniques auto-immunes, la polyarthrite rhumatoïde (PR) touche 0.3% de la population française, dont la qualité de vie est largement altérée, avec des poussées inflammatoires douloureuses et invalidantes. Dans 20-30% des cas, la maladie s'aggrave sévèrement conduisant à une destruction des cartilages osseux pouvant conduire à une incapacité fonctionnelle. De nombreuses approches thérapeutiques existent mais ne sont pas efficaces pour un grand nombre de patients et/ou présentant des effets secondaires sévères. Ce besoin médical non satisfait illustre la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Le rôle immunosuppresseur des lymphocytes Treg a été mis en évidence dans de nombreuses indications de pathologies auto-immunes à la fois chez l'animal et l'Homme. Une première démonstration préclinique de thérapie cellulaire utilisant les propres cellules T régulatrices du patient a été obtenue à l'aide de modèles d'arthrite aiguë et chronique obtenue chez la souris. Le présent projet vise, à développer l'utilisation de cellules Treg, modifiées génétiquement pour exprimer un récepteur chimérique (CAR) spécifique de protéines exprimées au niveau des articulations afin d'assurer l'activation des propriétés immunomodulatrices des CAR-Treg *in situ* au niveau même des articulations.

Le projet permettra de générer les données précliniques nécessaires à la preuve de concept de cette approche et les données précliniques nécessaires pour la constitution du dossier de soumission d'essai clinique de Phase Ib chez des patients arthritiques. Nous devons mettre en évidence que notre produit de thérapie cellulaire est efficace dans un modèle animal mimant la pathologie humaine. Nous utiliserons les modèles d'arthrite aiguë (CAIA), utilisant des anticorps spécifiques du Collagène de type II, mimant la phase de l'implication des autoanticorps pathogéniques observés chez les patients arthritiques. Dans ce modèle, les signes cliniques sont rapides et transitoires, réduisant ainsi l'impact sur le bien-être animal. Le développement non clinique des CAR-Treg dans la PR inclura également le modèle d'arthrite chronique (CIA), induite par l'immunisation des souris avec du Collagène-II, permettant de stimuler à la fois les lymphocytes T et B de l'immunité adaptative. A l'aide de ces deux modèles, nous pourrions mesurer l'impact des CAR-Treg sur l'action pathogénique des autoanticorps (modèle CAIA) et sur les réponses auto-immunes T et B, associées à la physiopathologie de la PR.

Nous réduirons le stress par des manipulations régulières des animaux et la douleur en appliquant des points limites les plus précoces possibles. Dans une approche éthique et rationalisant le nombre d'animaux, nous anticipons l'utilisation maximale de 5682 souris. Le présent projet de 5 ans comprend à la fois la génération des données d'efficacité, de bio-distribution couvrant le développement clinique des cellules CAR-Treg dans l'indication clinique de l'arthrite afin de répondre au besoin médical non satisfait des patientes PR ne répondant pas ou plus aux thérapies actuelles.

6046. La glycogénose de type 1a est une maladie génétique rare caractérisée par une incapacité de l'organisme à produire du glucose (sucre) pour maintenir leur glycémie (taux de sucre dans le sang) entre 2 repas. La maladie se caractérise par des hypoglycémies sévères rapidement après un repas. A plus long terme, ces patients vont développer des tumeurs hépatiques avec un risque important de transformation en cancer. A l'exception d'un contrôle nutritionnel très strict limitant les hypoglycémies, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette maladie. La transplantation hépatique est la seule solution lorsque le développement tumoral est trop important.

Entre les repas, la glycémie est normalement régulée grâce à une production de glucose assurée principalement par le foie (dégradation des stocks de glycogène qui constitue les réserves de sucres de l'organisme), mais aussi par les reins et l'intestin. Les souris atteintes de glycogénose de type 1a dans tous les tissus meurent généralement d'hypoglycémie dès le sevrage, en l'absence de thérapie génique ou d'apport régulier de sucre. En revanche, les souris qui présentent une glycogénose de type 1a induite uniquement dans le foie à l'âge adulte sont viables car elles sont capables de réguler leur glycémie au cours d'un jeûne prolongé en produisant du glucose par les reins et l'intestin. Ce modèle de souris représente un outil original et utile pour étudier le développement des tumeurs hépatiques qui se développent au long terme.

Dans ce projet, nous proposons de créer une nouvelle lignée de souris atteintes de glycogénose de type 1a dans le foie dès la naissance. Nous proposons d'étudier, dans un premier temps, la régulation de leur glycémie au cours d'un jeûne court. En effet, étant donné le rôle important de la production de glucose par le foie en période néonatale, ces souris pourraient développer des hypoglycémies après quelques heures de jeûne. Nous pourrions ensuite utiliser ces souris pour tester des approches de thérapie génique qui nécessitent l'injection d'un gène « médicament » dès la naissance ou en période néonatale. Plusieurs types de vecteurs couramment utilisés dans les essais de thérapie génique seront comparés dans le but de choisir le vecteur le plus efficace qui permettra de prévenir les hypoglycémies mais aussi le développement tumoral. Pour cela, un maximum de cellules du foie doit être corrigé, c'est à dire que les cellules doivent exprimer correctement le gène « médicament », afin d'éviter qu'un foyer de cellules non guéries se transforme en cellules cancéreuses. Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacement : La régulation de la glycémie implique une coordination de l'ensemble du métabolisme et est étroitement dépendante des variations hormonales ce qui exclut une approche en culture cellulaire. Il est donc important de disposer de modèles animaux permettant d'une part de mieux comprendre la pathologie et d'autre part de tester des approches thérapeutiques. Les tests de thérapie génique seront cependant validés dans un premier temps en cellules pour vérifier la bonne expression du gène médicament mais l'efficacité devra être évaluée chez l'animal avant d'être testée chez l'homme.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie et du métabolisme (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'études précédentes réalisées avec le modèle de « souris avec une glycogénose de type 1a inductible à l'âge adulte ». Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes d'un minimum 12 souris seront analysés. Les souris issues de la reproduction et de mauvais génotype seront utilisées pour la reproduction ou comme souris contrôles dans le projet. Au total, un nombre maximum de 462 souris sera utilisé dans ce projet. La non-toxicité des virus qui seront injectés sera systématiquement vérifiée sur cellules en culture lors de la titration des virus.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation et limiter au maximum le stress. Pour éviter le mal-être lié à une possible hypoglycémie, un suivi du comportement des souris selon une grille de critères définis (mobilité de l'animal, toilettage, température, couleur des oreilles, mesure de la glycémie si nécessaire) sera réalisé quotidiennement dès la naissance. La connaissance de la pathologie a permis de définir des points limites. Une attention particulière sera apportée sur l'accès à la nourriture qui sera facilité par la présence de croquettes dans la cage lors du sevrage et/ou de sucre dans l'eau de boisson. Le suivi de la prise de poids des animaux sera réalisé dès le jour 5 après la naissance pour établir leur courbe de croissance. Un anesthésique sera appliqué avant la prise de sang pour la mesure de la glycémie et des paramètres sanguins. Les essais de thérapie génique effectués chez des souriceaux seront réalisés en prenant soin de perturber au minimum l'interaction des souriceaux et de leur mère, en s'imprégnant de l'odeur de la litière avant de les manipuler et en contrôlant ensuite l'intégrité du nid. Afin d'éviter les risques d'hypothermie liés à la manipulation des nouveau-nés, une partie de la cage sera placée pendant 3 jours sur un tapis chauffant.

En conclusion, la caractérisation de ce nouveau modèle de souris atteintes de glycogénose de type 1a permettra de mieux comprendre le rôle de la production de glucose par le foie lors de la période néonatale et de traiter cette maladie chez le jeune animal par thérapie génique. Au total, cette étude nécessitera au maximum 462 souris sur une durée de 5 ans.

6047. La toxicité sérotoninergique, due à une accumulation excessive de sérotonine dans le cerveau, reste très mal connue chez l'Homme. Elle peut être provoquée par la prise de diverses molécules d'usage relativement courant, telles que les antidépresseurs, les antimigraineux et le MDMA (ou ecstasy). Elle est seulement caractérisée par une triade de signes cliniques composée d'anomalies neuromusculaires, d'altération de l'état mental et d'hyperactivité du système nerveux autonome. Cet ensemble de symptômes est appelé syndrome sérotoninergique, et il n'existe pas de paramètre biologique, ni marqueur prédictif permettant de détecter ce syndrome. Plus précisément, le mécanisme de survenue des convulsions reste lui aussi mal compris. De par cette définition peu précise, certaines prescriptions avec co-administration de médicaments agissant sur la sérotonine comportent des risques, et des cas d'intoxications sont traités à tort comme syndrome sérotoninergique.

C'est pourquoi ce projet s'attache à étudier cinq molécules connues pour induire ce syndrome chez l'Homme, afin de permettre une meilleure prescription des médicaments, un meilleur diagnostic et une meilleure prise en charge en cas d'intoxication. Pour cela, nous envisageons de mener à bien les objectifs suivants :

- 1-Etudier la toxicité neurologique et cardiaque induites par les cinq molécules choisies ;
- 2-Préciser les mécanismes exacts de cette toxicité ;
- 3-Définir un biomarqueur prédictif de la survenue de cette toxicité.

Dans le respect de la règle des 3R, ce projet a été élaboré de façon à réduire le plus possible le nombre d'animaux utilisés. En effet, l'ensemble des procédures prévues ne sont pas remplaçables par des expériences *in silico* ou *in vitro*, en raison de la nécessité d'une approche intégrée sur animal entier (non reproductible *in vitro*, intégrant de nombreux compartiments biologiques interagissant entre eux).

De plus, à la suite d'une veille bibliographique, les études envisagées ne reproduisent pas des études déjà publiées, afin d'éviter tout doublon, et le nombre d'animaux utilisés par groupe sera réduit à son strict minimum grâce à des tests statistiques, permettant des résultats interprétables avec un nombre minimum d'animaux utilisés.

Afin de limiter au mieux leur éventuel mal-être pendant l'expérimentation, le bien-être des animaux sera vérifié quotidiennement par un personnel qualifié et une prise en charge optimale sera effectuée en cas de mal-être (souffrance, modification du comportement...).

Ce projet sera mené chez le rat afin d'être cohérent avec la bibliographie déjà présente sur le sujet, les expériences étant effectuées principalement sur cette espèce, il nécessitera 308 rats.

Différentes procédures seront réalisées après administration des molécules étudiées afin d'analyser la pharmacocinétique et les effets métaboliques des différentes molécules, ainsi que les effets cardiaques et neurologiques sur les rats avec des examens tels que l'électrocardiogramme et l'électroencéphalogramme.

Cette étude nous permettra ainsi de mieux caractériser chez l'Homme la toxicité sérotoninergique, de comprendre le mécanisme de survenue des convulsions, de permettre une meilleure prescription des médicaments agissant sur le système sérotoninergique et une meilleure prise en charge en cas d'intoxication, grâce à un diagnostic plus rapide.

6048. Notre laboratoire développe un traitement pour la maladie de *Crigler-Najjar* (CN). Il s'agit d'une maladie héréditaire très rare qui atteint les cellules du foie. En France, elle concernerait moins d'une naissance sur un million. Elle se manifeste par une jaunisse très sévère, qui peut devenir mortelle si elle n'est pas très vite traitée. A l'origine de cette pathologie, une mutation de l'ADN entraîne la défaillance d'une enzyme synthétisée par le foie (UGT1A1) qui est normalement chargée d'éliminer de l'organisme la bilirubine, un composé extrêmement toxique. Chez les malades, ce déficit en UGT1A1 entraîne une accumulation de bilirubine dans tous les tissus, et en particulier dans le cerveau, provoquant de graves dommages neurologiques. Les patients les plus sévèrement touchés meurent généralement pendant l'enfance suite à ces atteintes cérébrales. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement curatif.

Nous avons donc élaboré au laboratoire un traitement de thérapie génique qui permet d'apporter aux cellules du foie, une nouvelle copie d'ADN qui compense le défaut génétique, afin que soit rétablie l'activité de l'enzyme UGT1A1, permettant ainsi l'élimination du composé toxique. Le traitement mis au point, un virus modifié, a prouvé son efficacité et son innocuité chez les modèles animaux de la maladie, notamment en démontrant l'élimination de la bilirubine chez les rats Gunn. Son évaluation chez l'homme est prévue pour 2017.

Lors de récents essais cliniques de thérapie génique utilisant le même type de virus modifié, les patients ont reçu simultanément un traitement anti-inflammatoire pour éviter toute réaction immunitaire. Ces anti-inflammatoires apparaissent nécessaires pour garantir le maintien de l'efficacité de la thérapie génique. L'évaluation clinique de notre candidat médicament doit donc tenir compte de ce paramètre. Avant de démarrer l'essai clinique, nous devons garantir aux autorités la compatibilité de ce type de traitement anti-inflammatoire dans le contexte de CN et évaluer ses effets sur notre candidat médicament.

Pour répondre à ces problématiques, il n'existe pas, à ce jour, de méthodes alternatives pour remplacer le modèle animal. Aussi, cette étude sera menée chez le rat GUNN, mutant naturel et modèle de la pathologie.

Toutefois, nous avons élaboré une stratégie expérimentale qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés et nos priorités seront leur bien-être ainsi que le raffinement des protocoles. Nous utiliserons tous les moyens à notre disposition pour éviter stress, douleur ou souffrance :

- Le traitement anti-inflammatoire qui sera utilisé est un produit couramment employé en clinique, permettant ainsi de se limiter à une seule posologie (principe de réduction).
- Seules les deux doses de virus modifié qui seront utilisées pour l'essai clinique seront testées dans cette étude (principe de réduction).
- Les rats mâles et femelles seront utilisés afin de réduire la taille de l'élevage (principe de réduction).
- Le nombre d'animaux a été estimé en fonction de nos connaissances actuelles et d'une analyse statistique afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible (principe de réduction).
- Un total de 60 rats sera nécessaire pour réaliser ce projet.
- Les interventions expérimentales prévues sont considérées comme légères, elles ne dépasseront jamais le degré de gravité 1. De plus, les prélèvements de sang se feront à la veine sous maxillaire (principe de raffinement).

Nous espérons ainsi montrer au terme du projet, la compatibilité d'un co-traitement anti-inflammatoire/virus modifié, afin de démarrer le premier essai clinique d'un médicament pour la maladie de *Crigler-Najjar*.

6049. La toxoplasmose est une parasitose cosmopolite due au parasite *Toxoplasma gondii*. Après infection, la dissémination du parasite dans l'organisme est généralement maîtrisée par le système immunitaire, mais le parasite persiste sous forme de kystes durant toute la vie du sujet. On estime sa prévalence en France à 40-50%. Si l'infection est asymptomatique dans 80 à 90% des cas, elle peut présenter un caractère de gravité dans certaines situations : 1) lorsque l'infection est acquise par une femme enceinte, elle peut être transmise au fœtus et générer des séquelles plus ou moins importantes; 2) chez l'immunodéprimé, l'infection est toujours grave et une réactivation d'infection ancienne peut survenir ; 3) enfin, certains génotypes parasitaires (très répandus en Amérique du sud et en Afrique) sont particulièrement virulents et capables de provoquer des tableaux sévères y compris chez l'adulte immunocompétent.

Le diagnostic repose habituellement sur la sérologie, qui permet de mettre en évidence des anticorps spécifiques en l'absence de signes cliniques. En France, les femmes enceintes séronégatives sont suivies mensuellement, et mises sous traitement en cas d'infection en cours de grossesse. Le diagnostic peut être fait par recherche des toxoplasmes dans le liquide amniotique ou à l'accouchement, sur le placenta et la sérologie chez le bébé. Les parasites peuvent être mis en évidence par biologie moléculaire (recherche d'ADN par polymérase Chain Reaction (PCR)) et par inoculation à la souris. Ces analyses sont cotées à la Nomenclature des actes de Biologie Médicale. Le diagnostic prénatal requiert un agrément délivré par l'Agence de Biomédecine. Chez l'immunodéprimé, les parasites sont habituellement recherchés par PCR, mais très occasionnellement, des prélèvements peuvent être inoculés a posteriori pour isoler la souche de parasites en cas de PCR positive.

L'inoculation à la souris reste une technique pratiquée dans de nombreux Centres Hospitaliers Universitaires, car, bien que moins sensible que la PCR, c'est une technique qui permet l'isolement des souches parasitaires pour le génotypage et les études de chimiosensibilité menées par le Centre National de Référence (CNR) de la toxoplasmose. Les retombées nationales et internationales



des travaux menés dans le cadre du réseau du CNR toxoplasmose sont importantes, la France étant l'un des pays les plus actifs sur cette maladie et leader en termes de diagnostic et de génotypage.

Concrètement, les souris sont inoculées avec 0.5 à 1 mL de prélèvement. Cinq à six semaines plus tard, une recherche d'anticorps toxoplasmiques est effectuée. En cas de sérologie positive, l'infection est avérée et la /les souris sont sacrifiées et les toxoplasmes sont recherchés dans le cerveau. Les cerveaux positifs sont envoyés au CNR pour typage de la souche. Dans le cadre du diagnostic de toxoplasmose congénitale, 6 souris sont inoculées par prélèvement (réglementaire). Au vu de notre activité annuelle, au maximum 1750 souris seront utilisées.

Les animaux sont hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R :

Remplacer : le modèle animal est encore considéré comme un acte médical d'intérêt et est précieux pour l'isolement et la conservation des parasites. En effet, le typage des parasites directement à partir des prélèvements de patients est difficilement réalisable, car les parasites sont souvent détectés en faible quantité. Le passage par la souris permet d'amplifier la quantité de parasites (multiplication dans les organes) et de récupérer facilement les kystes présents dans le cerveau, et contenant des milliers de parasites.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum nécessaire. De plus, à l'arrivée des prélèvements (liquide amniotique, placenta), le dossier de la patiente est examiné, et les inoculations ne sont pas réalisées si l'analyse ne paraît pas pleinement justifiée.

Raffiner : Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté (abris de plastiques, cartons, tunnels). A noter que l'infection est asymptomatique et ne génère aucune souffrance physique aux animaux, ni aucun signe visible d'infection.

6050. Ce projet fait partie d'un programme plus général dont l'objectif est de développer des produits à destination des séniors. Le présent projet s'intéresse particulièrement à la bioaccessibilité et la biodisponibilité de composés nutritionnels ; la bioaccessibilité correspond aux composés solubilisés dans le tractus digestif et accessibles pour l'absorption intestinale, alors que la biodisponibilité correspond aux composés parvenant dans la circulation sanguine et disponibles pour l'organisme.

Le premier objectif est de déterminer l'impact du type de protéines sur la biodisponibilité des acides aminés en comparant les caséines (protéines majoritaires dans les produits laitiers) et les protéines sériques (protéines du lactosérum). Ces résultats permettront d'apporter de nouvelles connaissances sur la cinétique de digestion des protéines sériques dans un produit laitier et de déterminer si ces protéines peuvent permettre une stimulation de la synthèse musculaire chez le séniors. Le second objectif est d'étudier l'impact de la source de calcium (carbonate de calcium ou phosphate de calcium) sur la biodisponibilité du calcium. Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre les facteurs influençant la biodisponibilité de ce minéral et de pouvoir à terme compléter de façon plus efficace les produits laitiers en calcium pour favoriser la minéralisation osseuse. Cette étude sera conduite sur le porc conventionnel pris comme modèle de l'Homme.

Trois produits laitiers seront distribués sous forme de repas test à maximum 16 porcs adultes. Les produits seront des gels laitiers à base de protéines sériques ou de la mozzarella à base de caséines et ils seront enrichis en calcium grâce à du carbonate de calcium ou du phosphate de calcium. Les porcs seront équipés d'un cathéter placé au niveau de la veine jugulaire et d'une canule duodénale. Pour ce faire, les animaux subiront une intervention chirurgicale sous anesthésie générale et l'utilisation raisonnée d'antalgiques permettra de réduire les souffrances de l'animal à leur minimum. Ainsi il sera possible de collecter des effluents digestifs et du sang à différents moments de la digestion. La quantification des acides aminés et du calcium dans les effluents nous permettra ainsi d'estimer la cinétique de bioaccessibilité de ceux-ci en fonction de l'aliment, tandis que la quantification dans le plasma nous donnera accès à leur biodisponibilité. Le dispositif prévu est un carré latin où tous les produits alimentaires seront testés sur chaque animal. La règle des 3R a été prise en compte dans la conception des procédures expérimentales. Tout d'abord « remplacer » car ce type d'études, pour lesquelles il n'existe pas de méthodes *in vitro*, ni *in silico*, nécessite l'utilisation d'animaux vivants.

Ensuite « réduire » grâce à la pose de canules digestives et de cathéter sanguin, qui permettra de ne travailler que sur 16 animaux au maximum quel que soit le nombre de produits testés, alors que sans cela il faudrait euthanasier un animal pour chaque point de mesure. De plus, comme chaque animal teste chaque produit nous réduisons au maximum le nombre de porcs et de répétitions. Pour finir « raffiner » en limitant au maximum la souffrance des animaux grâce à des antalgiques, des anesthésies et des soins quotidiens.

6051. Les molécules anti-angiogéniques ont démontré un effet important en thérapie anti tumorale. Cependant, ces traitements ne sont pas efficaces sur tous les types de cancers. Notre équipe travaille sur une molécule, CD146, qui est sécrétée par certaines cellules cancéreuses (pancréas, mélanome, sein, rein, ...) et qui possède des propriétés angiogéniques. Nous avons donc généré des anticorps spécifiques de CD146 soluble avec l'objectif de les utiliser comme molécules antiangiogéniques dans les pathologies tumorales.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent que ces anticorps pourraient avoir un réel intérêt thérapeutique en bloquant les effets angiogénique, métastatique et anti apoptotique de la molécule CD146. Le but de ce travail est d'évaluer l'intérêt de l'anticorps radiomarqué au <sup>68</sup>Gallium pour l'imagerie TEP comme test compagnon des stratégies thérapeutiques ciblant les voies du CD146. Pour ce faire, des souris seront implantées avec des cellules tumorales (cellules humaines issues de cancer colorectal et de mélanomes) et imagées une fois les tumeurs développées.

Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité réglementaire de conduire ce type de développement radiopharmaceutique chez l'homme sain, et le choix de l'espèce par le besoin d'un modèle animal immunodéficient déjà documenté permettant de favoriser la prise et le développement des cellules tumorales, en l'absence d'alternative possible (Remplacement). L'étude sera menée *in vivo* sur 24 souris (*Mus musculus*) : ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable ; la méthode d'évaluation choisie (imagerie) permet de réduire ce nombre d'animaux nécessaire

en permettant de suivre les paramètres d'intérêt pour chaque animal « sur la durée » (Réduction). Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels. Une grille d'évaluation de la douleur a été mise en place afin de réduire le stress et la douleur de l'animal. (Raffinement).

6052. La coccidiose aviaire due à *Eimeria acervulina* est une pathologie fréquente, particulièrement problématique dans les élevages de poulet de chair. Elle provoque peu ou pas de mortalité mais les conséquences zootechniques sont importantes avec une baisse du gain de poids des animaux et une augmentation de l'indice de consommation qui induisent une perte sèche pour l'éleveur.

Elle affecte majoritairement les jeunes animaux de 1 à 15 jours d'âge. A ce stade de la vie, le système immunitaire est encore considéré immature, rendant les animaux très sensibles à ce type d'affection. Il est difficile à l'heure actuelle de prévenir ces pathologies par un traitement efficace, sans risque pour l'environnement et sans risque de contamination des viandes destinées à la consommation humaine.

Notre laboratoire développe un immunostimulant capable d'activer rapidement le système immunitaire des animaux nouveau-nés afin de prévenir le développement des maladies infectieuses. Le potentiel de ce candidat produit a été préalablement évalué chez le poulet dans le contexte de la coccidiose aviaire induite expérimentalement par *Eimeria acervulina* sur un effectif réduit d'animaux. L'objectif de ce projet est d'une part de confirmer l'efficacité du produit qu'il soit injecté sous la forme fraîche ou congelée et d'autre part de confirmer son efficacité qu'il soit injecté par voie *in ovo* ou sous cutanée.

Ces expérimentations seront réalisées sur une période de 24 mois et nécessiteront 341 animaux au total.

La règle des trois R a été strictement respectée.

Remplacement : Toutes les mesures de « remplacement » ont été considérées au préalable à cette expérimentation. Néanmoins, ce projet ne peut être traité seulement *in vitro* pour plusieurs raisons. D'une part, la coccidiose aviaire fait intervenir un cycle parasitaire qui n'a lieu que chez l'animal vivant. D'autre part, la maturation du système immunitaire requiert la libre interaction entre les cellules du système immunitaire et le parasite. Enfin, les voies d'administration font intervenir des paramètres physiologiques de l'animal qui ne pourraient être modélisés *in vitro*. Afin d'établir la preuve d'efficacité de notre produit, nous devons donc conduire un test préclinique sur l'espèce cible.

Réduction : Le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été réduit à son minimum grâce à un plan d'expérience optimisé pour obtenir le maximum de données scientifiques, tout en maintenant une validité statistique suffisante du modèle pour garantir l'interprétabilité des résultats.

Raffinement : la méthodologie expérimentale a, elle aussi, été raffinée à son maximum par l'utilisation de méthodes analytiques sensibles et reproductibles qui limitent, in fine, le nombre d'animaux inclus dans l'étude. De plus, pour limiter le stress et améliorer la qualité de l'expérience, les animaux seront élevés avec soin en présence d'un enrichissement à base de jouet et aucun prélèvement « vigile » n'est prévu, car ils auraient pu induire un stress ou une douleur pour l'animal. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des volailles, en limitant leur stress et la souffrance au maximum.

6053. La reproduction chez les caprins a lieu naturellement à l'automne et en hiver (saison sexuelle). Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité des produits et du prix du lait. La mise à la reproduction hors saison sexuelle est une solution pour maintenir l'offre en lait ou fromage tout au long de l'année (enjeu majeur pour la filière caprine).

Différentes techniques sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction des chaleurs (comportement d'acceptation de la monte du mâle) et des ovulations sont la pratique la plus efficace pour désaisonner la reproduction. Or, le contexte réglementaire et sociétal 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 mâles sexuellement actifs. En élevage, sa mise en œuvre nécessite la préparation des boucs et des chèvres avec des traitements lumineux (ou photopériodiques) de désaisonnement ou des implants de mélatonine afin de rendre les chèvres réceptives aux boucs et les boucs sexuellement actifs. Toutefois, le développement de cette pratique en élevage est freiné par la forte variabilité des résultats obtenus, notamment dans le cadre de l'insémination artificielle, qui implique la détection des chaleurs des chèvres afin de les inséminer au bon moment et d'obtenir une fertilité satisfaisante. Or cette pratique est chronophage pour les éleveurs.

L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité de la détection automatisée des chaleurs, à l'aide de colliers portés par les chèvres et mesurant en continu leur niveau d'activité, après une induction des chaleurs et des ovulations par effet mâle.

Un total de 53 animaux (45 chèvres adultes en lactation et 8 boucs pubères), de race alpine, seront utilisés.

Ce protocole comprend 1 procédure concernant les prélèvements sanguins dans la veine jugulaire (au niveau du cou).

La règle des 3R sera respectée comme suit :

Remplacement :

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

Réduction :

Le nombre d'animaux a été défini de façon à pouvoir évaluer l'efficacité d'un système automatisé de détection des chaleurs et la fertilité des chèvres en fonction du moment de détection des chaleurs. En outre, il s'agit d'un groupe de chèvres élevées et mises à la reproduction à la même période dans la conduite habituelle de l'élevage.

Raffinement :

Les chèvres seront hébergées en groupe, sur une litière paillée, le milieu sera enrichi (pneus suspendus régulièrement remplis de foin, plateformes, brosses). Les chèvres feront l'objet d'une surveillance pendant toute la durée du protocole, en particulier au

moment de la traite deux fois par jour. En cas de symptôme inquiétant, une intervention vétérinaire aura lieu et l'animal sera sorti du protocole si nécessaire. Les prélèvements sanguins seront réalisés par des opérateurs expérimentés (animaliers). Des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, et si nécessaire application d'un baume antiseptique et cicatrisant).

6054. Hors myélomes, l'ostéosarcome (sarcome ostéogène) est la plus courante des tumeurs malignes osseuses primaires. Il a une prédilection pour la région des métaphyses des os longs tubulaires. 50 % des cas se produisent autour du genou. Il s'agit d'une tumeur maligne du tissu conjonctif (doux) dont les cellules néoplasiques présentent une différenciation ostéoblastique et forment de l'os tumoral. L'incidence de l'ostéosarcome est estimée à 5 cas par million d'habitants par an, provient le plus souvent dans la région métaphysaire des os longs tubulaires, avec 42 % se produisant dans le fémur, 19 % dans le tibia et 10 % dans l'humérus. En fonction de la rapidité de détection, du grade et de l'état métastatique, le pronostic de guérison est supérieur à 70 % si la pathologie est prise en charge précocement (grande amélioration au cours des dernières décennies) mais est mauvais dans le cas contraire avec de nombreux décès dus à des métastases (notamment pulmonaires) dans les deux ans.

Ce projet a pour but d'évaluer l'efficacité de la molécule X, agent anti tumoral ayant déjà démontré des effets *in vitro* prometteurs, sur un modèle murin d'ostéosarcome. Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité réglementaire de conduire ce type de développement chez l'homme en l'absence de données précliniques, et le choix de l'espèce par le besoin d'un modèle animal immunodéficient déjà documenté permettant de favoriser la prise et le développement des cellules tumorales, en l'absence d'alternative possible (3R : Remplacement). Il sera mené *in vivo* sur 45 souris (*Mus musculus*) : ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour assurer une analyse statistique ( $p < 0.05$ ) par test non paramétrique de Mann and Whitney. ; la méthode d'évaluation choisie (imagerie) permet de réduire ce nombre d'animaux nécessaire en permettant de suivre les paramètres d'intérêt pour chaque animal « sur la durée » (3R : Réduction). Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels (3R : Raffinement).

6055. Le cœur embryonnaire est une structure complexe qui est à l'origine d'une variété de malformations chez les nouveaux nés et enfants. Sa formation dépend de l'acide rétinolique (AR), un dérivé de la vitamine A. La carence en vitamine A est un problème de santé publique majeur. L'insuffisance d'apport maternel en vitamine A peut entraîner la mort du fœtus, ou un large éventail d'anomalies incluant des malformations cardiaques. Inversement, une exposition excessive à la vitamine A ou ses analogues cause de graves anomalies cardiaques congénitales. Les mécanismes moléculaires associés à ces anomalies sont peu connus. Notre étude a pour objectifs de mieux comprendre l'étiologie de ces malformations en utilisant la souris comme modèle d'étude. Au cours de l'embryogenèse, l'AR est synthétisé par la rétinaldéhyde déshydrogénase 2 (Raldh2). Nous souhaitons étudier les conséquences de l'inactivation de l'enzyme Raldh2 dans les différents lignages du cœur. Les souris Raldh2<sup>-/-</sup> ne sont pas viables. Afin de contourner ce problème et d'étudier les conséquences de l'inactivation de Raldh2 dans les différents lignages du cœur, nous utiliserons un mutant conditionnel, qui nous permet une inactivation tissu spécifique. La lignée de souris knock-out conditionnelle pour le gène Raldh2 sera croisée avec différentes lignées exprimant la recombinaise Cre pour supprimer Raldh2 dans les sous populations progénitrices qui contribuent à la formation du myocarde ainsi que dans les cardiomyocytes. Le cœur sera analysé à différents stades développementaux (jours 8.5 et 14.5) ainsi qu'à des stades post-natal (jour de naissance et 3 mois). La femelle gestante sera mise à mort. La corne utérine sera prélevée, les embryons seront extraits et mis à mort immédiatement. L'échocardiographie sera utilisée pour évaluer la fonction des cœurs chez les souris adultes. Nous utiliserons un échographe présent sur notre plateforme d'imagerie. Cet examen d'imagerie médicale est indolore mais est réalisé sous anesthésie générale afin d'assurer l'immobilité de la souris. Après imagerie, les souris seront mises à mort et les cœurs collectés afin d'être analysés. Afin d'assurer le bien-être des animaux, nous respecterons la réglementation européenne concernant la densité d'animaux par cage et les cycles d'éclairage diurne. Les souris seront plusieurs par cage (5-6) afin de respecter leur instinct grégaire. L'environnement sera enrichi par des maisonnettes en carton. Nous suivrons les nouveaux nés issus des différents croisements afin d'identifier le plus précocement possible l'apparition de cardiopathies ou des taux de mortalité périnatale anormalement élevés. Si de tels signes étaient observés, les croisements incriminés seraient stoppés et l'étude sera limitée aux stades embryonnaires. Après chaque procédure, nous nous assurerons qu'aucun animal ne présente de signe d'infection. Chez les adultes, nous rechercherons tous signes d'inconfort. Les souris dont les paramètres physiologiques seront modifiés seront mises à mort. Nous avons déterminé le nombre de nos souris afin de correspondre au concept des 3R (réduire, raffiner, remplacer). Dans ce projet, nous utiliserons 1456 souris qui seront hébergées collectivement, dans un milieu enrichi et dans une pièce thermo régulée avec un cycle 12h lumière/12h obscurité. Plusieurs fois par semaine (2 ou 3), la nourriture, la boisson et l'état clinique des souris seront vérifiés, avec un changement de litière hebdomadaire. Enfin, des points limites à ne pas franchir pour respecter le bien-être animal seront déterminés : soulagement de douleur ou mise à mort selon la réglementation.

6056. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. Quatre décès sur cinq par maladie cardiovasculaire dans le monde surviennent par crise cardiaque ou AVC. Il est possible de prévenir ce type de pathologies en intervenant sur les facteurs de risques (hypertension artérielle, diabète, obésité, dyslipidémie, tabagisme...). Ces maladies cardiovasculaires et ces facteurs de risque associés peuvent être étudiés au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal. Ces modèles permettent de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'apparition et l'évolution des maladies cardiovasculaires. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles permettra de proposer aux patients de nouvelles thérapies.

Dans la plupart des projets de recherche, les tests de criblages *in vitro* sont principalement effectués avec des lignées cellulaires, permettant de réaliser des tests simples dans les phases initiales d'un projet et d'identifier des molécules d'intérêts qui vont être optimisées. Dans des phases plus avancées, les molécules optimisées doivent être testées et validées sur un matériel biologique physiologiquement plus relevant ou récapitulant la pathologie. Or, les lignées cellulaires établies et disponibles dans le commerce par exemple, ont perdu certaines propriétés natives et voies de signalisation essentielles des cellules primaires (primo cultures provenant d'animaux). Il est donc indispensable de travailler sur les cellules primaires directement mises en culture après prélèvement chez l'animal.

Dans un premier temps, l'utilisation des cellules primaires va permettre d'évaluer l'implication et/ou l'engagement de cibles dans la pathologie ou ses facteurs de risques associés. Dans un second temps, des molécules sélectives et spécifiques de ces cibles vont être synthétisées, identifiées puis optimisées afin de développer un candidat médicament.

Dans le cadre spécifique de ce projet, les primo cultures doivent être réalisées à partir de cœurs de rats nouveau-nés. Les cellules cardiaques une fois isolées présentent une activité contractile spontanée et physiologique qui ne peut être substituée par d'autres types cellulaires plus rudimentaires. D'autre part, les cellules cardiaques néonatales ont l'avantage de tolérer un maintien en culture de plusieurs jours contrairement aux cardiomyocytes d'animaux adultes qui meurent ou se différencient après 24 heures d'isolement. Ainsi il est possible de réaliser plusieurs types d'évaluations en parallèle à partir d'une seule primo culture.

Dans le domaine cardiovasculaire, ces études sur des cellules primaires permettent de réduire le nombre d'études sur tissus, organes isolés puis sur animaux *in vivo* et contribuent par conséquent à réduire le nombre d'animaux nécessaire à la sélection de candidats médicaments.

Ces expériences *in vitro* vont permettre ainsi de vérifier non seulement l'efficacité de la molécule sur sa cible, mais également son innocuité dans un contexte physiopathologique pertinent.

Tous les animaux bénéficient de conditions d'hébergement enrichies spécifiquement pour chaque espèce, favorables à l'expression de leurs instincts (nidification, jeu, fouissage ...) et adaptées à leurs besoins.

Sur 5 ans, il nécessitera l'utilisation de 10500 rats nouveau-nés et leurs 1050 femelles nourricières associées.

6057. La réglementation internationale impose aux laboratoires pharmaceutiques d'effectuer des contrôles qualité d'efficacité et d'innocuité sur chaque lot de vaccin produit.

Ce projet porte sur l'évaluation sur animaux de l'immunogénicité des vaccins destinés à l'homme qui est l'une des méthodes prescrites pour les contrôles d'efficacité. Un test d'immunogénicité consiste à administrer un vaccin à des animaux, les héberger pendant la période nécessaire à l'obtention d'une réponse immunitaire, puis à recueillir le sang qui sera analysé par des méthodes *in vitro* pour la recherche d'un ou plusieurs types d'anticorps.

Ce projet décrit les essais réalisés systématiquement (exigence réglementaire) sur chaque lot de vaccins produits en routine, concerné par cette méthode de contrôle qualité et sur certains autres vaccins en cas d'anomalie de fabrication de production pour aider à la recherche de la cause ou pour optimiser un procédé de fabrication ou de contrôle de vaccins. Il concerne également un test de raffinement et de réduction qui est en cours de développement. Enfin, il concerne les tests nécessaires à la qualification des vaccins utilisés comme références dans ces tests d'immunogénicité et ceux qui sont nécessaires pour qualifier les personnes qui réalisent les tests.

Les espèces employées pour ces tests sont la souris et le cobaye. Il est estimé qu'au cours de ce projet, mené sur une durée de 5 ans, 97 500 souris et 19000 cobayes seront utilisés.

Les bénéfices attendus pour ce projet sont la mise sur le marché des lots de vaccins protégeant efficacement les populations (conformes aux spécifications et aux textes de référence) après les tests de contrôle qualité ainsi que l'optimisation des procédés et la formation de personnel. Toutes les procédures incluses dans le projet sont de degré de sévérité léger. Aucun signe clinique ni altération du bien-être animal imputables aux tests ne sont attendus. Si toutefois un animal venait à présenter des signes de maladie, il serait pris en charge par un vétérinaire. L'ensemble des animaux utilisés pour ce projet est euthanasié selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'Ethique et la Structure de Bien-être Animal dont relève l'Etablissement Utilisateur.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement

Pour plusieurs valences vaccinales testées, le test *in vivo* d'immunogénicité de routine est remplacé par un test *in vitro* reconnu par la pharmacopée européenne lorsque cela est possible.

Réduction

Le schéma expérimental des tests de ce projet a fait l'objet d'une revue par des biostatisticiens afin de calculer au plus juste le nombre d'animaux à utiliser tout en restant en accord avec les exigences réglementaires. Un test est également en cours de développement afin de permettre le contrôle de 3 valences simultanément sans multiplier les prélèvements sur les animaux.

Raffinement

Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des dispositifs d'enrichissement dans des locaux appropriés, conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé.

6058. La sclérose en plaque (MS pour multiple sclerosis) est une maladie auto-immune chronique qui touche plus de 2.3 millions de personnes dans le monde et induit des atteintes neurologiques invalidantes. Différentes formes cliniques existent selon les lésions observées dans le système nerveux central (CNS) et la détérioration des fonctions neurologiques. La forme la plus courante est la forme RR-MS (Relapsing Remitting Multiple Sclerosis) dans laquelle les patients sont affectés par des crises, espacées par des

périodes de rémission. Pour cette forme, il existe de nombreux modèles *in vivo* dont le modèle d'Encéphalite Auto-immune Expérimentale (EAE) induite chez la souris C57BL/6 par immunisation avec la myéline oligodendrocyte glycoprotéine (MOG), une protéine exprimée dans le CNS. Dans ce modèle dit chronique, les souris développent des signes d'atteintes neurologiques conduisant à une paralysie progressive des membres postérieurs puis antérieurs. Il existe aussi des formes moins fréquentes telles que la forme Primary Progressive (PP-MS) pour laquelle peu de traitements sont développés et dont la physiopathologie n'implique pas en priorité une altération prononcée de la barrière hémato-encéphalique.

Les patients atteints de MS ont une qualité de vie extrêmement altérée selon l'intensité et la fréquence des crises. Il est désormais établi que les lymphocytes B ont un rôle important dans la pathophysiologie de MS. Récemment, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD20 (Rituximab) déplaçant certaines populations de cellules B a été approuvée pour le traitement clinique de MS. Nous souhaitons évaluer l'approche de thérapies cellulaires autologues utilisant les propres cellules T régulatrices (Treg) du patient. Elles seront isolées à partir du sang, expansées et modifiées par génie génétique pour induire l'expression d'une molécule chimérique spécifique du CD20 humain (CD20-CAR Treg) permettant un ciblage spécifique et local de leur activité immunorégulatrice et anti-inflammatoire.

Le rôle des Treg a largement été démontré dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Chez les patients atteints de MS, une réduction du nombre ou de la fonction des Treg ont été décrites. L'approche d'une thérapie cellulaire basée sur la génération des cellules CAR Treg est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre comparée aux molécules de type stéroïdien par exemple et pourrait apporter une nouvelle approche pour les patients réfractaires aux traitements actuels. Afin de pouvoir développer cette approche thérapeutique chez les patients atteints de MS, il convient de démontrer son efficacité et sa sécurité chez l'animal. Ces données non-cliniques seront la base pour constituer les dossiers réglementaires de soumission d'essai clinique. Dans une approche éthique, nous prévoyons de limiter au maximum le nombre d'animaux avec des scores cliniques sévères et de mettre en place des points limites adaptés. Ainsi, nous anticipons un nombre de 1767 souris pour l'utilisation du modèle murin d'EAE. Nous veillerons à optimiser les conditions d'hébergement pour limiter l'inconfort des animaux souffrant de paralysie des membres. Les cellules CAR-Treg à tester seront au préalable caractérisées et sélectionnées *in vitro*. Ce projet comprend à la fois la génération des données d'efficacité, de pharmacocinétique et de comparaison avec le Rituximab.

6059. Le mélanome de la peau représente 2 à 3% des cas de cancers, son incidence est en augmentation (+10% par an depuis 50 ans). Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer en France, son incidence est en baisse chez l'homme et en augmentation chez la femme. Ces deux types de cancer peuvent engendrer des métastases dans le reste de l'organisme et tous les patients ne peuvent pas bénéficier des nouvelles thérapies (biothérapie ciblée, chimiothérapie systémique ou régionale). Seule une faible partie de la population répond à ces traitements. De ce fait, nous pensons que la stratégie anti-tumorale, que nous voulons développer, pourrait être efficace sur ces 2 types de cancer. De plus, il existe des lignées cellulaires de mélanome (cancer de la peau) et de cancer pulmonaire commerciales utilisables pour faire le suivi du développement tumoral à l'aide de nos appareils d'imagerie. Les traitements locorégionaux thermiques comme l'ablation par radiofréquences (RFA) sont très utilisés à l'hôpital pour le traitement de tumeurs primitives et de métastases notamment des métastases du foie, quand le traitement chirurgical n'est pas réalisable. Ces types de traitement ont montré une augmentation de la réponse immunitaire chez des patients, cependant des taux élevés de récurrence locale et générale compromettent l'efficacité du traitement par RFA.

Notre projet consiste à injecter, directement dans la tumeur résiduelle à la suite du traitement par RFA, un gel contenant une association de plusieurs molécules activant le système immunitaire. Ceci pourra stimuler la réponse immunitaire contre des métastases distantes du site traité, qu'elles soient non visibles ou trop petites pour une chirurgie. Cette formulation (gel associé aux activateurs de l'immunité) injectée dans le site de traitement intègre deux concepts fondamentaux de la réponse immune anti-tumorale : le recrutement (rassemblement) et la maturation de cellules spécialisées dans la reconnaissance de cellules indésirables (par exemple les cellules cancéreuses). Nous pensons que ces deux concepts pourraient être bénéfiques dans le cadre de métastases pulmonaires et/ou de métastases issues de tumeurs de mélanomes.

Le but de ce projet est de vérifier l'efficacité d'une stratégie visant à favoriser la réponse immunitaire anti tumorale. Elle associera un traitement locorégional thermique (l'ablation par radiofréquence ; RFA) d'une métastase primaire présente sous la peau et l'injection dans cette tumeur d'un gel contenant des composés amplifiant la réponse immune. Ce procédé sera appliqué pour traiter des métastases secondaires à distance de la tumeur traitée par RFA.

Pour ce projet, nous aurons recours à l'utilisation de 238 souris. Dans le cadre de la réglementation sur l'expérimentation animale et pour réduire le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons des méthodes d'imageries non douloureuses et non traumatisantes pour suivre l'évolution des tumeurs. De plus, afin de comparer nos résultats entre eux, nous utiliserons des modèles mathématiques permettant d'avoir recours au minimum d'animaux, tout en ayant un fort potentiel de comparaison.

Pour toutes les manipulations d'animaux pouvant entraîner une souffrance notamment la procédure chirurgicale, nous aurons recours à l'anesthésie générale des animaux et l'administration d'antidouleur aux doses adaptées. L'anesthésie entraînant une hypothermie, les animaux seront placés sur des tapis chauffants pendant la chirurgie et ensuite en cage de réveil thermostatée jusqu'à reprise de la conscience totale.

6060. L'épilepsie est un trouble neurologique courant. Son incidence varie de 0,3 % à 0,5 % dans différentes populations au niveau mondial, et la maladie est résistante aux médicaments antiépileptiques classiques chez une grande proportion de patients. L'hippocampe est l'une des régions cérébrales qui induit le plus couramment des convulsions chez les patients épileptiques. La neurochirurgie visant à retirer le foyer épileptique dans l'hippocampe est la seule stratégie thérapeutique disponible pour traiter l'épilepsie résistante aux médicaments. Par conséquent, il existe un besoin de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement

de ces affections médicales. Il a récemment été montré que des rats en bonne santé tolèrent parfaitement bien l'application de doses très élevées de rayonnement ( $> 100$  Gy) dans l'hippocampe par des faisceaux de rayons X particuliers. Ce traitement induit le contrôle des convulsions dans un modèle d'épilepsie du cortex sensorimoteur chez le rat. Ce projet a pour objectif d'évaluer en détail la capacité de ces faisceaux de rayons X à (i) traiter l'épilepsie résistante aux médicaments, (ii) soutenir la neurogenèse et (iii) fournir une modalité d'imagerie entièrement innovante pour identifier des lésions de l'ordre du micron induites par ces faisceaux de rayons X. Ce dernier point serait également utile pour les applications translationnelles à la clinique visant à identifier précocement des microlésions dans les phases pré-symptomatiques des maladies neurologiques. Le projet utilisera des rats chez lesquels une épilepsie chronique sera induite par des substances chimiques. Les rats épileptiques seront irradiés par des rayons X visant à réduire ou interrompre les convulsions. Les rats seront surveillés à court et à long terme avec une évaluation clinique neurologique des convulsions, du comportement moteur, cognitif et dépressif et une imagerie cérébrale par tomographie à émission de positrons et IRM. Une modalité d'imagerie hautement sensible permettant de visualiser de manière non invasive les cerveaux sera utilisée afin de générer des images 3D à contraste élevé avec une résolution de l'ordre du micron.

Nous utiliserons 1 120 rats *Sprague-Dawley* mâles (âgés de 8 semaines) qui seront surveillés pendant 3 ou 6 mois après les protocoles expérimentaux. Le nombre d'animaux provient des calculs statistiques visant à obtenir des données statistiquement significatives. Le contrôle des convulsions sera évalué par une analyse neurocomportementale (comportement moteur, cognitif et dépressif) associée à une observation à long terme et à un enregistrement vidéo. Tous les efforts seront faits pour réduire la gêne et la souffrance de tous les animaux, conformément aux exigences de remplacement (ces procédures expérimentales seront utilisées, faute de méthode alternative), de réduction (le nombre minimal d'animaux permettant d'atteindre les objectifs scientifiques objets de l'hypothèse de ce projet a été déterminé par l'analyse de la puissance statistique) et de raffinement (nous utiliserons les procédures scientifiques qui entraînent le moins de gêne, de stress, de douleur et de lésions à long terme chez les animaux).

6061. La radiothérapie externe est une thérapie de référence pour le traitement des tumeurs solides. Elle est délivrée classiquement en séances quotidiennes à une dose de 2 Gy, sur une période de 7 à 8 semaines. Ce schéma est supposé comme optimal considérant le délai de réparation qui permet une meilleure récupération des tissus sains avoisinant la tumeur cible. Néanmoins, la précision balistique des appareils de radiothérapie de dernière génération offre la possibilité d'épargner grandement les tissus sains, et par conséquent d'augmenter la dose par fraction sur le volume tumoral cible. Ces schémas, dits "hypo fractionnés", présentent des avantages en terme de confort pour le patient, et de coûts pour la société. Cependant, l'impact biologique et clinique de ces schémas à plus forte dose par fraction reste largement inexploré.

Dans le cadre du plan Cancer, nous souhaitons étudier l'influence de la dose par fraction dans la réponse thérapeutique à la radiothérapie. En effet, de plus fortes doses par fraction peuvent interférer avec le réseau vasculaire intra-tumoral, et donc avec l'efficacité de la radiothérapie qui dépend de la présence d'oxygène. Ces paramètres ne peuvent pas être étudiés *in vitro* et il n'existe pas de procédure de remplacement.

Des tumeurs (cancer prostatique PC3) implantées en sous-cutanée chez la souris NMRInu seront irradiées pendant deux semaines selon différents schémas. Dans le but d'étudier la réponse phénotypique de la vascularisation, l'expression de marqueurs spécifiques dans le réseau sanguin sera évaluée pendant les deux semaines de traitement par échographie de contraste à l'aide de microbulles couplées à des anticorps, injectées en intraveineuse à J0, J3, J7, J11. Juste avant sacrifice, du pimonidazole (marqueur de l'hypoxie) et du Hoechst 33342 (indicateur de perfusion) seront injectés en intraveineuse. Ceci permettra de comparer la validité des résultats obtenus par échographie en comparaison avec les modifications vasculaires déjà validées au niveau microscopique.

Les groupes seront constitués de 10 animaux, et l'expérience sera réalisée 3 fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats et d'obtenir une significativité statistique. Un total de 150 souris NMRInu sera utilisé pour ces expériences. Une stratégie de réduction sera mise en place au cas où les résultats seraient atteints dès 2 expériences. Pour leur confort, les souris seront hébergées en groupes invariables (5 par cage) avec enrichissement et surveillance active.

Ce projet permettra de déterminer si une imagerie fonctionnelle par échographie de contraste présente un intérêt en pratique clinique pour identifier la réoxygénation tumorale en cours de radiothérapie, et pourrait avoir des applications à court terme.

6062. Contrôle de l'activité des préparations vaccinales par un essai avec épreuve virulente décrit par la monographie de la pharmacopée européenne chez la souris.

L'activité du lot est calculée en fonction du nombre de souris protégées par la vaccination en comparaison avec un vaccin de référence testé en parallèle.

Cet essai est classé en gravité sévère.

Cet essai est utilisé pour le Contrôle Qualité des vaccins antirabiques destinés au chien et au chat, avant commercialisation de chaque lot de vaccin.

Il peut être également utilisé dans les études réglementaires de stabilité des vaccins, ainsi qu'en Recherche et Développement de nouveaux vaccins (essai de suspensions vaccinales ou de vaccins).

Les éléments mis en place dans le cadre des 3R sont : recours à des points limites précis afin de réduire ou supprimer la douleur, présence d'enrichissements dans les cages d'hébergement, utilisation de témoins communs au contrôle de plusieurs lots afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Une méthode alternative à ce test, basée sur la sérologie, est par ailleurs en cours de mise au point.

60000 souris seront utilisées dans ce projet, réparties comme suit : 230 souris par semaine soit 12000 par an.

6063. L'épilepsie-absence est une des formes les plus communes d'épilepsie idiopathique chez l'enfant. Chez ces patients, les crises se développent progressivement au cours de la maturation cérébrale et mettent en jeu des processus de structuration de réseaux épileptiques qui restent mal connus. Une fois développées, les crises s'accompagnent d'épisodes transitoires d'altérations de la conscience dont les mécanismes précis sont inconnus. Ce projet se propose d'examiner au niveau cellulaire et des réseaux neuronaux les modifications fonctionnelles et morphologiques qui conduisent à l'émergence progressive et au maintien des crises d'absence dans un modèle d'épilepsie chez le rat. Après avoir déterminé l'âge exact de survenue des crises dans ce modèle et la meilleure période pour l'introduction d'un traitement pharmacologique, ce projet visera à évaluer de nouvelles approches non pharmacologiques qui pourraient soulager des patients résistants aux traitements.

Un suivi des enregistrements électroencéphalographiques (EEG) chez des rats ne présentant pas encore de crises permettra de déterminer l'âge exact de survenue des crises épileptiques et leur évolution à l'âge adulte ainsi que la période à laquelle des traitements antiépileptiques seraient les plus efficaces afin d'enrayer la survenue de crises récurrentes. L'âge auquel les cellules des différentes couches du cortex acquièrent des caractéristiques épileptiques et la façon dont ces activités se mettent en place au sein du futur cortex épileptique seront étudiés. Des enregistrements *in vivo* de l'activité du réseau neuronal permettront d'étudier simultanément l'activité des cellules neuronales et gliales avant l'apparition des crises, pendant la période de mise en place de l'activité épileptique et lors de l'apparition des crises matures à l'âge adulte.

Chez les animaux adultes ayant développé des crises, la possibilité d'une anomalie du réseau glial cortical et/ou d'un dysfonctionnement des relations neurone-glie conduisant à la survenue des crises sera explorée. De même, la possibilité de mise en jeu de certaines structures impliquées dans l'induction du sommeil comme pouvant promouvoir la perte de contact associée aux crises sera recherchée. Enfin, des approches à visées thérapeutiques par irradiation ou par micro-refroidissement du cortex épileptique seront évaluées dans ce modèle.

Remplacement : Aucun modèle cellulaire ou computationnel ne peut mimer la crise épileptique spontanée. Ce projet a pour but d'appréhender le comportement électrophysiologique spontané de réseaux neuronaux pathologiques au décours des crises d'épilepsie-absences survenant spontanément chez l'animal. De ce fait, il est impossible de remplacer notre préparation *in vivo* par un modèle cellulaire ou une simulation computationnelle. En outre, l'exploration des mécanismes qui conduisent à l'émergence de crises d'épilepsie (épileptogenèse) est impossible à réaliser chez l'homme.

Au total, un maximum de 1032 animaux sera nécessaire à l'ensemble de ce projet qui durera 5 ans et débutera dès que le projet sera autorisé.

Réduction : ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement : Une part importante de ce projet implique l'exploration d'activités électroencéphalographique (EEG) spontanées chez l'animal. Avant, pendant et après implantation stéréotaxique d'électrodes (et de canules guides le cas échéant pour des injections intracérébrales), les animaux sont manipulés et suivis quotidiennement afin de prévenir toute douleur chez l'animal.

6064. Un total de 29,5% des patients admis en réanimation présentent une infection sévère d'origine bactérienne (sepsis) à l'admission ou lors de leur hospitalisation. Parmi ces patients le taux de mortalité est élevé (25,8%). Lors d'une infection bactérienne, l'initiation de la réponse défensive débute par la reconnaissance de la bactérie par des cellules immunitaires appelées macrophages, dont il existe une grande variété. Cette reconnaissance passe par une cascade de réactions et la production de certains facteurs inflammatoires dont les cytokines.

Indépendamment du sepsis, l'activité physique permet une amélioration de la réponse des macrophages face aux bactéries.

L'objectif de l'équipe, à terme, est d'évaluer l'effet de l'exercice physique sur l'activation et la modulation de la réponse inflammatoire dans le cadre du sepsis. L'hypothèse est que l'exercice physique induirait une réponse inflammatoire plus précoce et efficace ce qui permettrait d'améliorer le pronostic des patients. Ces travaux auront pour objectif d'identifier les mécanismes et les cibles thérapeutiques potentielles dans le cadre de la prise en charge du sepsis.

L'objectif du présent projet est de mettre au point certains aspects d'une procédure d'exercice physique et de l'induction d'un sepsis chez la souris C57BL/6 en vue d'expérimentations ultérieures. Pour cela, 30 souris seront nécessaires, réparties en 3 groupes successifs.

Groupe 1 : 10 souris seront soumises à la procédure 1 : après une période d'acclimatation à l'animalerie d'une semaine puis une semaine de familiarisation au tapis roulant, un exercice physique modéré quotidien sera demandé sur une semaine. Ce premier groupe permettra de vérifier que 100% des individus sont capables de faire l'exercice demandé et que la durée de familiarisation prévue est suffisante. Il permettra peut-être aussi d'identifier des difficultés non encore envisagées. A la fin de la procédure 1, toutes les souris entrent en procédure 2 (induction du sepsis) pour permettre d'atteindre la meilleure reproductibilité du geste chirurgical et de mettre en évidence d'éventuelles difficultés techniques.

Groupe 2 : Sur 10 autres souris, après une période d'acclimatation à l'animalerie d'une semaine, un sepsis sera induit par instillation trachéale de *Klebsiella pneumoniae* (procédure 2). Ce deuxième groupe permettra de contrôler que les taux de mortalités attendus se vérifient.

Groupe 3 : 10 souris pourront être utilisées pour adapter la procédure 2 si la quantité de bactéries à instiller nécessite d'être réajusté afin d'atteindre les objectifs de mortalité.

Les procédures sont établies dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement : Tant l'exercice physique que le sepsis passent par des mécanismes intégratifs et nécessitent l'utilisation de l'animal. Dans ce cadre-là, le remplacement est impossible.

Réduction : Les effectifs ont été calculés de façon à utiliser un nombre minimum d'animaux.

Raffinement : Tous les efforts sont faits pour limiter la souffrance des animaux avec une surveillance appropriée et une prise en charge antalgique adaptée à l'état de l'animal.

6065. Le besoin en greffes de foie est estimé à 1600/an en France. Actuellement, ce besoin est couvert partiellement par 1134 greffes dont la quasi-totalité des greffons est d'origine post-mortem. Cette pénurie impose le recours à d'autres sources de greffons. La transplantation hépatique à donneur vivant (THDV) constitue une alternative attractive pour pallier ce manque, cependant le principal frein au développement de cette technique est le risque de morbi-mortalité encouru par le donneur. Ce risque est corrélé à la quantité du parenchyme réséqué et au volume du foie restant pour le donneur (seuil minimum de 0,5% du poids du lobe restant par rapport au poids total du patient).

Pour les mêmes raisons, la résection des tumeurs constitue un risque pour le patient. Par ailleurs, même si le volume hépatique reste suffisant, une Insuffisance Hépatique Post Opératoire (IHPO) peut s'installer dans 8% des cas des hépatectomies majeures.

La ligature de la veine porte ou son embolisation totale peuvent être effectuées avant une hépatectomie majeure pour permettre l'hypertrophie du foie restant par atrophie du lobe à retirer. Néanmoins, l'utilisation de ces 2 techniques ne permet pas de livrer un futur greffon de qualité optimale et représente un risque pour le donneur (produit d'embolisation et complications possibles).

Nous avons identifié, lors de nos travaux précédents, un pré-conditionnement du donneur capable de déclencher la régénération hépatique du futur foie restant sans engendrer de conséquences atrophiques pour le greffon. Ce pré-conditionnement consiste en une diminution de 20% de la circonférence de la veine porte gauche (VPG) du futur greffon chez le donneur.

Nous poursuivons ces travaux par le développement d'un dispositif endo-vasculaire capable de recréer les effets de notre pré conditionnement de 20% de la VPG. L'établissement du pré conditionnement par voie endo-vasculaire présentera l'avantage supplémentaire de minimiser la morbidité de ce geste. Nous réalisons ces mises au point chez le porc, qui est un très bon modèle pour la transplantation hépatique à donneur vivant.

Ce projet sera composé de 3 grandes parties :

- 1 - Conception et validation du dispositif endo-vasculaire capable de reproduire le modèle du pré-conditionnement chirurgical
- 2 - Evaluation de l'innocuité du pré-conditionnement (croissance tumorale) et des mécanismes moléculaires déclenchés par celui-ci.
- 3 - Validation de l'efficacité du pré-conditionnement en condition de THDV, évaluation comparative de la morbi-mortalité du prélèvement hépatique droit avec et sans pré-conditionnement.

L'étude sera réalisée sur 78 porcs (4-6 mois, 40 +/- 5 kg). Ce nombre est minimalisé tout en permettant l'obtention de résultats robustes. 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 9m<sup>2</sup> avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure). Tous les moyens nécessaires pour la sédation, l'anesthésie et l'antalgie seront utilisés pour une bonne prise en charge de la douleur.

6066. Le tryptophane est un acide aminé essentiel nécessaire à la biosynthèse des protéines et c'est aussi un précurseur de la sérotonine, un neurotransmetteur impliqué dans le stress et l'anxiété. Notre hypothèse est que des altérations du métabolisme du tryptophane induit des altérations du comportement anxieux et de la réactivité au stress.

Sept lignées de souris seront étudiées, avec pour chaque lignée quatre groupes de seize souris soit au total 448 souris.

En application de la règle des 3R au modèle utilisé dans l'étude:

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. L'étude des effets du stress repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Les études cérébrales requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés, les analyses tissulaires nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=8 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress induisant de la douleur physique. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes).

6067. La dégénérescence rétinienne (DR) est à la base de nombreuses maladies oculaires humaines qui mènent inexorablement vers un handicap visuel permanent, voire la cécité totale. Les trois maladies les plus importantes en termes de nombre de personnes affectées sont le glaucome, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la rétinopathie diabétique (RD). Ensemble, elles touchent environ 200 millions de personnes à travers le monde. Les trois sont actuellement sans remède, et toutes sont en constante augmentation. Leurs origines sont à la fois génétiques et environnementales, et ces pathologies se caractérisent par un début de la maladie qui passe souvent inaperçu sur le plan clinique, associé à une progression lente. Les souffrances occasionnées aux patients ainsi que les coûts médicaux générés ont fait de la santé visuelle un enjeu crucial de la société. Bien que de nombreux modèles animaux (rats, souris transgéniques ou non) soient disponibles, nos connaissances actuelles et notre compréhension de la physiopathologie de la rétine restent incomplètes et controversées. Les pathologies de la rétine touchent les deux types des photorécepteurs, aussi bien les bâtonnets que les cônes. Mais la perte des cônes, responsables de la vision de jour, de l'acuité visuelle et de la sensibilité chromatique chez l'homme, conduit inexorablement à un handicap visuel sévère tel qu'on observe dans la DMLA et la RD. Or les modèles de laboratoire disponibles, rat et souris, rongeurs nocturnes dont les rétines ne contiennent que très peu de



cônes (<3%) ont limité les investigations possibles, en particulier sur la physiologie des cônes. Le but de notre projet de recherche est de mieux comprendre les causes cellulaires et moléculaires, et les conséquences structurelles et fonctionnelles, des atteintes des photorécepteurs dans les maladies comme la DMLA ou la RD. De même, le projet vise à explorer des pistes thérapeutiques susceptibles de limiter la perte de la vision, voire restaurer la vue. Nous allons mener nos recherches aussi bien chez les espèces de rongeurs nocturnes « classiques » souris et rat (dont les nombreux acquis scientifiques facilitent les comparaisons, et ouvrent l'accès à des modèles animaux génétiquement modifiés), que des espèces diurnes « exotiques » tel que le Rat du Nil (*Arvicanthis ansorgei*) et le Rat des Sables (*Psammomys obesus*) (nous avons démontré qu'ils possèdent une rétine riche en cônes, plus proche de la macula humaine). Le Rat du Nil constitue un modèle de choix pour mieux comprendre la physiopathologie des cônes, y compris dans les maladies telles que la DMLA. Le Rat des Sables représente un très bon modèle animal du diabète de type II, ouvrant ainsi la possibilité d'étudier la RD.

Le nombre d'animaux nécessaires durant les 5 années du projet est de 1341 individus au total, toutes espèces confondues. Ces chiffres prennent en compte nos efforts de respecter scrupuleusement la règle des 3R: 1. "remplacer", il s'agit ici d'expériences réalisées sur le système visuel dans son intégralité, de la détection de la lumière jusqu'aux réponses fonctionnelles et comportementales. La complexité de ces réseaux rend impossible l'utilisation de modèles *in vitro* qui ne peuvent refléter les interactions entre cellules. Par contre, nous allons faire appel à de telles approches quand c'est justifié, pour vérifier l'efficacité des approches en biologie moléculaire. Des modèles cellulaires *in vitro*, préparés à partir des rétines de porc, seront exploités dans ce sens ; 2. "réduire", nous allons analyser des sous-groupes (définis par traitement, par âge) de n=10, le nombre nécessaire pour pouvoir valider les résultats par test statistique de significativité; 3. "raffiner", chaque espèce et/ou souche modifiée est choisie en fonction de sa pertinence pour fournir un maximum d'informations et de modéliser le plus fidèlement possible la vision centrale humaine. Encore une fois, les rongeurs diurnes ont une structure rétinienne similaire à la macula humaine, et les souches de souris génétiquement modifiées elles aussi sont choisies par rapport à la compréhension des maladies induisant une cécité dans l'espèce humaine.

Nous allons modéliser le stress rétinien et la DR par des approches soient "environnementales" (lumière intense, injection de drogue, alimentation adaptée), soient génétiques. Pour les premières, ces approches sont déjà utilisées par d'autres laboratoires afin de reproduire les endommagements rétiens observés lors des maladies telles que la DMLA ou la RD. Par ailleurs, la lumière intense est considérée comme un facteur de risque de la DMLA, et l'obésité un facteur de risque de la RD, chez l'homme. Pour les approches génétiques, nous allons examiner des modèles transgéniques qui correspondraient au mieux aux maladies rétiennes humaines. Les souris, témoins et génétiquement modifiées, seront également utilisées pour adresser le rôle subsidiaire important des bâtonnets et de leurs interactions avec les cônes. En effet la DR humaine implique souvent la disparition initiale des bâtonnets, suivie secondairement par celle des cônes, sans que l'on sache exactement le lien entre les deux populations.

Sur beaucoup d'animaux, la fonction des rétines normales ou en voie de dégénérescence sera analysée par électrorétinographie (ERG), qui permet de quantifier la capacité de répondre à des stimuli lumineux, ainsi que par des tests de comportement. De même, l'aspect du fond d'œil sera examiné par examen non-invasif (ophtalmoscopie). Les animaux seront hébergés en cages enrichies avec du matériel de nidation et des bâtons à ronger. Les procédures ERG et ophtalmoscopie seront réalisées sous anesthésie générale.

6068. L'ischémie-reperfusion est une séquence inhérente à la transplantation d'organe solide. L'ischémie correspond à la phase où l'organe du donneur est isolé de la circulation sanguine et subit un défaut d'apport en nutriments et en oxygène, c'est-à-dire depuis le prélèvement chez le donneur jusqu'à la remise en circulation de l'organe chez le receveur. La reperfusion de l'organe chez le receveur se traduit par une reprise de la circulation sanguine en lien avec le retour de l'apport en nutriments et en oxygène. Dans le cas de la greffe de foie, la séquence d'ischémie-reperfusion peut entraîner des lésions sévères du foie transplanté, à l'origine de dysfonctions du greffon et potentiellement de rejet de l'organe à court et long terme.

Des travaux récents en modélisation animale suggèrent la mise en jeu du système immunitaire dans les lésions tissulaires hépatiques observées au décours immédiat de la séquence d'ischémie-reperfusion.

Notre objectif général est :

1) de caractériser les éléments cellulaires de l'immunité ainsi que les molécules solubles impliquées dans l'inflammation, dénommées interleukines et leurs récepteurs, qui sont responsables des effets délétères accompagnant la séquence d'ischémie-reperfusion hépatique.

2) d'explorer si des outils neutralisant les molécules délétères ainsi identifiées peuvent constituer *in fine* les cibles de nouvelles armes thérapeutiques pour réduire les dysfonctions du greffon hépatique.

Pour mener à bien ce programme de recherche, nous utiliserons un modèle murin avec deux types d'ischémie-reperfusion :

1) une ischémie-reperfusion dite « chaude », c'est-à-dire en interrompant le flux sanguin hépatique puis en le rétablissant chez le même animal,

2) une ischémie-reperfusion dite « froide » en transplantation, c'est-à-dire en transplantant le foie d'une Souris donneuse à une Souris receveuse en refroidissant le greffon avant l'implantation avec un liquide de préservation à 4°C, de façon à se rapprocher au plus près des techniques utilisées chez l'Homme.

L'implication des cellules immunitaires de type iNKT ainsi que d'interleukines et leurs récepteurs sera recherchée *in vivo* en utilisant des Souris respectivement rendues déficientes pour ces éléments cellulaires et moléculaires par transgénèse.

La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet. Les méthodes d'étude *in vitro* sont très limitées pour étudier l'ischémie-reperfusion hépatique car trois éléments très importants sont absents dans les modèles de culture cellulaire : 1/ la complexité des populations cellulaires du foie, 2/ son architecture, qui organise les relations entre ces populations cellulaires, 3/ sa vascularisation, qui permet la circulation des cellules immunitaires et des molécules vers des zones et donc des populations cellulaires spécifiques. Il est donc nécessaire d'évaluer la mise en jeu des éléments immunitaires dans les lésions d'ischémie-reperfusion en utilisant un

modèle animal. Le choix de la Souris repose sur l'utilisation de souris transgéniques irremplaçables et à notre expertise acquise dans la lecture des réponses immunes chez la Souris.

Pour ce projet de 5 ans, nous utiliserons un total de 600 animaux, minimum requis pour les analyses statistiques, découlant d'un compromis entre les questions de minimisation d'une part et l'accès à l'information scientifique d'autre part, et établi selon les expérimentations antérieures publiées par le laboratoire en modélisation des réponses immunes chez la souris.

Enfin, dans un souci de raffinement, une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux tout au long de la vie de ceux-ci. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien de leur état de santé, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées (enrichissement du milieu...) et des procédures seront mises en place en cas de problèmes observés (soins ou euthanasie si un point limite est atteint). Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et les animaux, hébergés en groupe, bénéficieront d'une analgésie afin de réduire au minimum la douleur liée à la chirurgie. Elles seront de plus réalisées par un personnel compétent et formé à l'expérimentation animale, ce qui permettra ainsi de réduire l'angoisse des animaux et de contribuer à leur bien-être.

6069. La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très fréquente et invalidante et représente donc un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations chez les patients, avec une érosion osseuse et une déformation irréversible des articulations.

Il existe plusieurs stratégies de traitement de cette pathologie, mais aucune ne permet une stabilisation complète à long terme et encore moins une rémission. De nombreux travaux ont permis l'émergence de biothérapies basées sur l'inhibition de certaines voies d'inflammation (anti-TNFs, anti-IL17, ...). Il existe actuellement plusieurs pistes de recherche pour tenter de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pouvant prendre le relais ou remplacer les traitements actuels, en échec dans un nombre important de cas. Un projet précédent a permis de mettre au point une nanoparticule nouvelle et efficace contre cette pathologie. Le présent projet vise à valider cette particule en vue d'un essai clinique pour remplacer ou seconder les médicaments actuels. Nous devons établir le mécanisme d'action et contrôler que la version clinique développée actuellement présente bien les mêmes propriétés que la version préclinique précédemment évaluée.

Cette étude comprend deux phases : I/ évaluation des formulations et détermination de la formulation optimale ainsi que ses modes d'administration et II/ Etude par imagerie de la biodistribution des liposomes, de leur modes d'action et détermination de paramètres d'imagerie pour l'évaluation précoce des effets thérapeutiques. La phase I comporte deux parties : 1/confirmation des effets préventifs du traitement, et 2/ évaluation des possibles effets curatifs.

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

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

Les procédures d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux lors des manipulations. Au total 688 souris seront utilisées dans ce projet.

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

6070. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont des bactéries de la flore commensale pouvant être responsables d'infections nosocomiales et d'infections communautaires.

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. L'émergence de la résistance à la méticilline chez les souches de *S. aureus* et la production de toxines par certains d'entre eux, augmentant la virulence de la bactérie, complique la prise en charge des patients. De même, l'augmentation de la résistance aux bêta-lactamines chez les entérobactéries entraîne également des difficultés de prise en charge.

Face à l'augmentation continue des résistances bactériennes, il apparaît donc indispensable d'évaluer de nouvelles molécules.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité *in vivo* d'un nouvel antibiotique dans le modèle d'infection de cuisse à *S. aureus*, *E. coli* et *K. pneumoniae*, chez la souris neutropénique.

Pour cela, 921 souris Swiss femelles vont être utilisées.

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

- Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'un 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 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 : figure 5, annexe 1.

- Pendant l'expérimentation :

- o Soins pré et post opératoire : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,05mg/kg) 30minutes avant l'infection puis 8h après.
- o Evaluation des signes généraux : Application des points limites
- o Euthanasie : dislocation cervicale après pré anesthésie par inhalation d'isoflurane

6071. Bien que les chimiothérapies aient été considérées comme une stratégie prometteuse pour bloquer la croissance tumorale, leur utilisation en clinique s'avère limitée du fait du développement de la résistance à certaines molécules. L'identification des facteurs participant à cette résistance est donc essentielle pour l'amélioration des traitements anti-cancéreux. Par ailleurs, l'évolution du mode de vie dans les pays développés avec une augmentation régulière des personnes en surpoids, voire souffrant d'une obésité, ainsi que l'augmentation de l'incidence des hépatocarcinomes (HCC) dans cette même population, illustre l'importance d'identifier les facteurs impliqués dans le développement de ces tumeurs et l'influence de l'obésité dans leur développement.

Nous avons identifié parmi ces protéines, RelB qui semble jouer un rôle critique dans l'invasion des cellules tumorales et dans leur métabolisme. Dans un 1er temps nous souhaitons confirmer nos résultats obtenus *in vitro* sur les cellules tumorales, en créant un modèle de souris transgéniques pour le gène codant pour cette protéine.

Le phénotype général de ces souris génétiquement modifiées sera étudié en vérifiant l'impact de cette modification génétique sur leur physiologie (suivi du poids, taille, anomalies morphologiques d'organes), leur génotype et leur fertilité.

Nous étudierons ensuite l'impact de cette protéine dans un modèle de développement d'hépatocarcinome chimique, et enfin l'impact d'un régime alimentaire riche en gras sur le développement du HCC chez ces souris (souris soumises à un régime riche en gras vs un régime pauvre en gras).

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous limiterons le nombre d'expérience et de souris nécessaires. Nous travaillerons sur 234 souris génétiquement modifiées. Une surveillance journalière sera réalisée, des antalgiques seront injectés en cas de douleur, et des points-limites ont été établis qui entraînent la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce travail permettra de valider le rôle de cette protéine dans le développement tumoral *in vivo* et de mieux comprendre son mécanisme d'action. Nous espérons que ce travail aboutira au développement de nouveaux outils diagnostic et à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques des cancers.

6072. Ce projet concerne la mise au point d'une épreuve virulente sur une espèce de carnivore domestique. Cette épreuve virulente, une fois mise au point, permettra de tester l'efficacité de plusieurs produits immunologiques destinés à protéger cette espèce de carnivore domestique contre une maladie mortelle. L'évaluation de l'efficacité de ces produits immunologiques fera l'objet d'une autre demande d'autorisation de projet.

La réalisation de ce projet comprend une procédure expérimentale. Elle permettra de déterminer les conditions optimales d'utilisation de la souche d'épreuve disponible actuellement (et/ou d'une nouvelle souche d'épreuve). Ainsi, l'efficacité de produits immunologiques pourra être évaluée dans un second temps.

Différentes conditions d'utilisation de la souche d'épreuve disponible actuellement et/ou d'une nouvelle souche pourront être testées dans le cadre de ce projet.

Ce projet requiert au maximum l'utilisation de 72 carnivores domestiques.

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

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes expérimentales alternatives,
- un nombre d'animaux envisagé par groupe déterminé dans le but d'obtenir des données valides,
- un hébergement des animaux en groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement,
- un recours à l'anesthésie générale lors de certaines phases, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal,
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long de la procédure,
- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

6073. La réglementation en matière d'expérimentation animale prévoit des travaux pratiques sur animal vivant. L'objectif de cette formation est de sensibiliser les futurs concepteurs de projets (chercheurs), qui seront amenés à manipuler des animaux de laboratoire, à se familiariser avec le rongeur mais aussi de leur apprendre les bons gestes techniques (de contention, de préhension). Dans le cadre du respect de la règle des 3R, le remplacement de l'animal n'est pas toujours possible, notamment lors des séances de TP.

Toutefois, pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons seulement une souris par apprenant et un rat pour deux apprenants.

Rappelons qu'en 2014, les rats représentaient 7% des animaux utilisés en laboratoire de recherche contre 42% pour les souris

Les animaux utilisés durant des travaux pratiques le seront pour un seul TP d'une durée de 4h. Trois formateurs expérimentés seront présents à chaque séance de TP de manière à encadrer un petit groupe d'apprenants, chacun réalisera tour à tour les manipulations sous l'œil exercé du formateur.

Les différentes techniques et voies d'injections/prélèvements seront rappelées, les gestes et les voies d'injections les mieux adaptées seront précisées pour chaque expérience.

L'apprentissage de ces gestes bien exécutés a pour objet de contribuer au bien-être animal et de permettre de réduire la douleur lors de leur exécution. Seuls des procédures faiblement invasives seront réalisées sur rats et souris.

Ce projet de 5 ans compte 4 formations annuelles soit un total de 20 formations. Chaque formation nécessitera 20 souris et 10 rats soit un total de 400 souris et 200 rats.

6074. Parmi les nombreuses cellules qui composent le système immunitaire, les lymphocytes T régulateurs (Tregs) ont un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie. Le dysfonctionnement de ces cellules est mis en évidence dans de nombreuses pathologies, maladies autoimmunes, cancers ou rejets de greffe d'organes. Nous avons notamment observé une altération des lymphocytes Treg chez des patients transplantés rénaux présentant un rejet chronique médié par les anticorps, principale cause de perte de greffon rénale à long-terme. Par ailleurs, nous avons mis en évidence la forte expression de la molécule Tribbles 1 (TRIB1) dans ces cellules régulatrices et l'interaction physique de TRIB1 avec une molécule centrale dans le développement et la fonction des Tregs, la molécule FOXP3. Cependant la fonction de cette molécule TRIB1 dans les Treg n'est pas connue à ce jour. Nous initiions un projet visant à décrire la fonction cellulaire de TRIB1 dans les Tregs. Etant donnée le rôle très variable de TRIB1 (par exemple décrit *in vitro* comme étant dans certains cas antiprolifératif et dans d'autre pro-prolifératif), nous étudierons son implication dans diverses pathologies, *via* des modèles murins complémentaires.

Ces résultats se traduiront par la description du rôle de TRIB1 dans les Tregs et donc une meilleure compréhension de la biologie des Tregs. Une meilleure appréhension des mécanismes cellulaires des Tregs est indispensable à l'identification de nouvelles stratégies de modulation de ces Tregs en immunothérapies, dans le but de traiter les désordres pathologiques où elles sont impliquées. Au total, nous avons prévus d'utiliser 420 souris. Il s'agit cependant d'une estimation haute puisque les objectifs (ie différences significatives) pourront être atteints avant ce nombre.

La règle des 3R sera suivie de la façon suivante:

-l'utilisation d'un modèle animal est justifiée par l'absence de système *in vitro* alternatifs permettant de reproduire la complexité multicellulaire d'un organisme et les interactions cellulaires notamment dans le cadre de la transplantation et de maladies auto-immunes (Remplace).

-le nombre d'animaux retenu a été calculé afin de permettre une interprétation fiable, statistiquement justifiable, et suffisante des résultats. Les analyses effectuées seront guidées par des tests *in vitro* préalables. De plus, les modèles ont été choisis par leur robustesse même si des variabilités ne peuvent être écartées, inhérents à toute expérience *in vivo* (Réduire).

- des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux, les animaux seront suivis régulièrement dont la fréquence dépend de la procédure. Tous les animaux seront analysés post-mortem pour caractériser la réponse immunitaire (Raffiner).

6075. Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. En dépit des nombreux plans mis en place pour prévenir et traiter les cancers et malgré les progrès de la médecine et des traitements, le nombre de cas de cancer diagnostiqué dans le monde reste considérable. Les principales approches de traitements sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, et l'hormonothérapie. Depuis quelques années, l'immunothérapie paraît être une nouvelle option pour limiter le risque de récurrence du cancer. Ceci est rendu possible grâce notamment à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-tumorale et du rôle du système immunitaire dans le développement de la tumeur.

En effet, on sait aujourd'hui que la réponse immunitaire est essentielle pour éliminer la tumeur, que ce soit par la réponse innée (cellules NK, cellules présentatrices d'antigènes) ou par la réponse adaptative (lymphocytes T et B). Seulement, de nombreux mécanismes suppresseurs déjouant la surveillance du système immunitaire ont été mis en évidence lors du développement des tumeurs. Ces mécanismes présents physiologiquement deviennent indésirables quand il s'agit d'éliminer les cellules tumorales puisqu'ils régulent le système immunitaire, ce qui conduit à un développement tumoral non contrôlé.

Parmi ces mécanismes suppresseurs, on distingue des populations suppressives (Treg, MDSC) ou des récepteurs inhibiteurs (PD-1, CTLA-4). Certaines de ces molécules sont déjà des cibles thérapeutiques dans quelques essais cliniques pour certains cancers. Ces essais ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins.

Ainsi, nous souhaitons tout d'abord examiner dans le développement tumoral le rôle d'un gène : SIRPalpha exprimé par les MDSC et macrophages, pour lequel nous avons déjà étudié le rôle chez la souris immunocompétente. Nous savons que ce gène participe à des mécanismes permettant l'échappement tumoral chez la souris. Nous voulons maintenant étudier si les effets observés chez la souris sont présents chez l'Homme.

D'un point de vue thérapeutique, nous proposons de traiter des souris humanisées avec des traitements ciblant le système immunitaire humain.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques mimant le système immunitaire humain, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies combinées chez la souris humanisée. Le nombre maximum d'animaux utilisé sera de 2880 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfourer et se cacher.

6076. La radiothérapie externe est une thérapie de référence pour le traitement des tumeurs solides. Elle est délivrée classiquement en séances quotidiennes à une dose de 2 Gy, sur une période de 7 à 8 semaines. Ce schéma est supposé comme optimal considérant le délai de réparation qui permet une meilleure récupération des tissus sains avoisinant la tumeur cible. Néanmoins, la précision balistique des appareils de radiothérapie de dernière génération offre la possibilité d'épargner grandement les tissus sains, et par conséquent d'augmenter la dose par fraction sur le volume tumoral cible. Ces schémas, dits "hypofractionnés", présentent des avantages en terme de confort pour le patient, et de coûts pour la société. Cependant, l'impact biologique et clinique de ces schémas à plus forte dose par fraction reste largement inexploré.

Dans le cadre du plan Cancer "Influence du fractionnement de dose de radiothérapie sur le microenvironnement tumoral", nous souhaitons étudier l'influence de la dose par fraction dans la réponse thérapeutique à la radiothérapie. En effet, de plus fortes doses par fraction peuvent interférer avec deux événements biologiques majeurs: 1- Le réseau vasculaire intra-tumoral pourrait être détruit ou produire une réaction inflammatoire d'ampleur variable. 2- la réponse immunitaire anti-tumorale pourrait être modulée par les signaux vasculaires. Ces deux paramètres ne peuvent pas être étudiés *in vitro* et il n'existe pas de procédure de remplacement.

Deux modèles de tumeurs implantées en sous-cutanée chez la souris (cancer bronchique LLC sur souris C57BL/6 et cancer prostatique PC3 sur souris NMRInu) seront irradiés pendant deux semaines selon différents schémas: ctl, 10 x 2 Gy, 6 x 4 Gy, 3 x 8 Gy et 2 x 12 Gy. Les animaux seront sacrifiés à J14 après la première irradiation, les tumeurs seront excisées et dissociées. Les populations cellulaires d'intérêt (vasculaires, immunitaires) seront immédiatement triées à l'état viable, leur transcriptome et radiosensibilité seront analysés *in vitro*.

Les groupes seront constitués de 10 animaux, et chaque expérience sera réalisée 3 fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats et d'obtenir une significativité statistique. Un total de 160 souris C57 et 160 souris NMRInu sera utilisé pour ces expériences, en tenant compte d'expériences pilotes décrites dans ce dossier (mises au point). Une stratégie de réduction sera mise en place au cas où les résultats seraient atteints dès 2 expériences. Pour leur confort, les souris seront hébergées en groupes invariables (5 par cage) avec enrichissement et surveillance active afin d'appliquer des points limite si nécessaire.

6077. Notre équipe étudie l'effet du rythme circadien (un mécanisme moléculaire qui adapte le métabolisme de l'organisme en fonction des cycles jour/nuit) sur le développement des tumeurs et sur la capacité des cellules cancéreuses à migrer et former des métastases.

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

Suite à ces études *in vitro*, nous devons valider nos résultats chez l'animal, en utilisant des croisements entre des lignées de souris mutantes développant spontanément des tumeurs mammaires (MMTV-Py et MMTV-cNeu) et des lignées de souris mutantes pour le rythme circadien, aussi bien pour les phases diurnes ou nocturnes.

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

Notre projet prend en considération la règle des 3Rs:

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

Réduire: nous avons défini nos plans d'expérience afin d'avoir un nombre d'animaux par lot (10) permettant de réaliser des analyses statistiques discriminantes entre lots contrôles et lots expérimentaux. Afin de donner plus de significativité à notre étude, nous avons également décidé d'utiliser deux lignées différentes de souris développant spontanément des tumeurs mammaires.

Raffiner: les animaux seront hébergés dans une animalerie agréée et manipulés par des personnes formées. Les cages comprendront des éléments pour enrichir l'environnement des animaux et leur permettre de reproduire des comportements naturels (exploration, fouissement, nidification). Les animaux seront visités quotidiennement afin d'évaluer leur état de santé et leur comportement. Un traitement analgésique par injection sera appliqué à l'apparition des symptômes suivants : perte d'appétit, poil hérissé et terne, problème de motricité. Afin de limiter la souffrance des animaux, nous avons défini 4 points limites au-delà desquels les animaux seront sacrifiés : (1) état physiologique anormal (prostration, perte de poids supérieur à 10% par rapport à la mesure antérieure ou de 20% par rapport à la pesée initiale), (2) taille des tumeurs primaires dépassant 1700mm<sup>3</sup>, (3) détection de micro-métastases pulmonaires par imagerie non invasive ou (4) âge des animaux dépassant la limite de 180 jours pour la lignée MMTV-Py, 360 jours pour la lignée MMTV-cNeu et 64 jours pour les animaux greffés.

L'ensemble de l'étude devrait nécessiter environ 720 souris pour trois procédures expérimentales. La première procédure correspondant à l'étude de souris MMTV-Py nécessite 240 souris (12 lots expérimentaux et 12 lots contrôles de 10 souris), la deuxième procédure correspondant à l'étude de souris MMTV-cNeu nécessite 240 souris (12 lots expérimentaux et 12 lots contrôles de 10 souris) et la troisième procédure correspondant aux expérimentations de greffe nécessite 240 souris (12 lots expérimentaux et 12 lots contrôles de 10 souris).

6078. 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 Hedgehog 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 Hedgehog (dont Dhh, Smo, Gli3, Cdon, et Gas1) dans le but de caractériser leur rôle dans les cellules endothéliales. Ce programme de recherche sur 5 ans impliquera 1224 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.

6079. Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité, nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les virus oncolytiques sont une nouvelle classe d'agent thérapeutique pouvant être une alternative au traitement des cancers. Par définition, un virus oncolytique est un virus qui démontre une réplication et une lyse spécifique des cellules tumorales.

L'objectif de ce projet est d'évaluer et de comparer dans différents modèles de cancers murins différents virus oncolytiques issus du virus de la vaccine et exprimant des gènes thérapeutiques (virus « armés »). De plus, sachant que le développement clinique de ces virus prévoit de les combiner avec de la chimiothérapie ou de l'immunothérapie afin de potentialiser l'activité anti-tumorale, le projet se propose d'explorer dans les modèles murins les combinaisons de ces virus avec différentes substances ayant une activité anti-tumorale.

Le premier point abordé sera d'évaluer l'activité thérapeutique anti-tumorale des virus de la vaccine oncolytiques « armés » en association ou non avec des substances à activité anti-tumorale. Cette activité thérapeutique sera analysée dans différents modèles murins. Le second objectif de ce projet sera de déterminer le mode d'action de ces vecteurs oncolytiques.

Pour les expériences que nous mènerons nous serons vigilants à mettre en œuvre la règle des 3R :

Remplacer dès que possible : Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable. Réduire le nombre de souris utilisées : un nombre maximal de 1360 souris est envisagé pour ce projet. Le nombre d'animaux par groupe expérimental est optimisé afin d'obtenir des résultats significatifs malgré les variations entre animaux. Chaque expérimentation sera dupliquée afin de valider les résultats obtenus.

Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce. Les animaux sont hébergés en cage collective pendant toute la durée des expérimentations (5 souris au maximum par cage), dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères, avec eau et nourriture ad libitum. Les effets secondaires dus au traitement seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux (prostration, poil hirsute, amaigrissement, taille limite des tumeurs) sont mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

6080. Si la consommation d'un bol alimentaire équilibré est indispensable à la santé du fait des composants à effet positif qu'il contient, sont également présents des polluants chimiques dont la conséquence peut être l'apparition de dysfonctionnements voire de pathologies liés à l'alimentation. Pour prévenir et/ou limiter les effets négatifs sur le cerveau de l'exposition à ces polluants contenus dans l'alimentation, l'ingestion simultanée d'ingrédients à effet positif, comme des bactéries probiotiques, présents dans un « aliment fonctionnel » pourrait constituer une solution. C'est ainsi que les effets cérébraux de certains polluants qui se traduisent par une augmentation du niveau d'anxiété pourraient être contrebalancés par l'ingestion de probiotiques ayant des propriétés modulatrices visant à réduire ce même niveau d'anxiété.

Le projet exposé ici a pour objectif de cribler des souches à potentiel probiotique pour leur capacité de survie dans le tractus gastro-intestinal (TGI) des souris et leur effet modulateur potentiel du niveau d'anxiété. Ce projet qui inclura 78 souris Swiss femelles adultes sur un an sera décliné en 2 parties :

La première partie du projet consistera donc à tester la capacité des souches bactériennes à survivre dans le TGI des souris, cette propriété étant généralement considérée comme un facteur clé pour prédire un effet des bactéries probiotiques sur la santé. A partir d'une banque de 14 souches bactériennes d'une collection constituée au laboratoire et testées *in vitro* pour leur résistance à l'acidité (pH2 et pH4) et aux sels biliaires, les 6 souches les plus résistantes seront retenues pour l'étude *in vivo* de résistance au passage dans le TGI des souris. Pour cela, les souris recevront les bactéries par voie orale et les bactéries survivantes seront alors dénombrées dans les selles au cours des 9 heures suivant l'administration. A l'issue de ce crible, les 4 souches qui survivent le mieux seront conservées pour la seconde partie du projet. Les animaux issus de cette expérience seront mis à mort selon les recommandations éthiques si aucune réutilisation des animaux n'est possible ou envisagée en raison d'un risque non contrôlable de colonisation du TGI par les bactéries, qui pourrait influencer sur les études comportementales ultérieures.

La seconde partie du projet visera à évaluer les effets positifs sur le comportement de l'administration répétée de ces bactéries. Pour cela, les bactéries seront administrées aux souris par voie orale durant 28 jours et leurs effets sur l'anxiété seront mesurés dans 3 tests comportementaux : l'openfield, la boîte clair-obscur et le labyrinthe en croix surélevée.

A l'issue des tests comportementaux, les animaux seront mis à mort, selon les recommandations éthiques, et les cerveaux seront prélevés en vue de réaliser des analyses histologiques de l'activité fonctionnelle cérébrale dans différentes régions d'intérêt.

Ce travail nécessite le recours à l'animal entier seul mimant la complexité de l'organisme pour l'étude de la survie des bactéries et de leurs effets modulateurs du niveau d'anxiété. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives (remplacement). Le nombre d'animaux sera cependant limité au minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats (réduction/raffinement). Les procédures de classe légères n'impliquent aucune douleur et aucune mesure analgésique n'est nécessaire (raffinement limité aux mesures de raffinement d'hébergement).

6081. Le stress est un facteur environnemental majeur favorisant l'apparition ou la rechute de troubles psychiatriques tels que la dépression majeure, l'anxiété chronique, ou des troubles du stress post-traumatique (PTSD). La fréquence de ces troubles est particulièrement élevée dans notre société moderne. En effet, 20% des français sont atteints d'une maladie psychiatrique (contre 1% pour le cancer), et les maladies mentales se classent au deuxième rang des causes mondiales de handicap. L'impact social et économique de ces troubles est donc considérable, et nécessite un accès fréquent aux hospitalisations. Les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent ces troubles sont encore méconnus ce qui freine l'avancée de nouvelles thérapies.

Afin de comprendre les mécanismes reliant le stress aux troubles psychiatriques qui en découlent, notre équipe s'intéresse aux circuits neuronaux dérégulés par le stress et pouvant sous-tendre ces troubles comportementaux. Nous nous intéressons à une structure cérébrale en particulier, le noyau latérodorsal du tegmentum (LDTg) et son rôle dans la modulation de l'activité de certaines régions du cerveau, comme l'amygdale, impliquées dans les réponses aux stimuli aversifs. Les résultats préliminaires de notre équipe suggèrent l'existence de projections cérébrales directes reliant le LDTg à l'amygdale, supposant une interaction fonctionnelle entre ces deux régions.

Le présent projet aura donc trois objectifs principaux :

i) Décrire anatomiquement les projections entre le LDTg et les différentes sous-structures de l'amygdale, et définir la nature du ou des neuromédiateur(s) utilisé(s) par ces connections.

ii) Étudier les changements d'activités causés par le stress au sein de ces projections.

iii) Déterminer le rôle des projections du LDTg dans l'apparition des symptômes comportementaux (peur conditionnée, anxiété) associés au stress en modulant spécifiquement l'activité de ces projections.

Pour parvenir à ces objectifs, notre projet sera découpé en 3 procédures nécessitant l'utilisation de 900 souris mâles adultes sauvages et transgéniques. Nous combinerons des approches comportementales et électrophysiologiques et utiliserons des outils viraux permettant une modulation ciblée des projections étudiées.

i) Procédure 1 : Étude anatomique des projections du LDTg. Dans cette procédure histologique, nous utiliserons des vecteurs viraux pour injecter des traceurs fluorescents dans le cerveau des souris afin de mettre en évidence les structures connectées directement au LDTg et la nature des informations chimiques qu'ils s'échangent.

ii) Procédure 2 : Rôle du LDTg dans le test de peur conditionnée. Dans cette procédure comportementale, nous inhiberons spécifiquement les projections du LDTg vers l'amygdale durant des tests comportementaux visant à mesurer l'importance de ces projections dans le conditionnement de la peur et l'anxiété.

iii) Procédure 3 : Rôle du LDTg dans les adaptations cellulaires liées au test de peur conditionnée. Dans cette procédure électrophysiologique, nous mesurerons les adaptations moléculaires et cellulaires mises en place dans les projections LDTg-amygdale après un stress.

L'ensemble du projet nécessitera 900 souris.

Les procédures présentées dans ce projet ont été pensées afin de prendre en compte les objectifs de la règle des 3R :

Remplacement : La souris est le modèle le plus adéquat pour cette étude car la complexité des structures et circuits cérébraux dérégulés par le stress chez l'homme est conservée chez la souris. De plus, ce projet requiert des animaux transgéniques afin de cibler spécifiquement des populations neuronales données.

Réduction : Chaque souris est utilisée dans autant de procédures qu'il est envisageable sans qu'elles interfèrent entre elles, dans le but de limiter le nombre d'animaux. Les tests statistiques sont choisis afin d'obtenir la meilleure significativité avec un minimum d'individu.

Raffinement : Les résultats comportementaux dépendent directement du niveau de stress des animaux. Nous portons donc une attention particulière aux conditions d'hébergement et de soin des animaux, ainsi qu'à la diminution du stress et de la douleur à leur minimum pour chaque procédure (suivi quotidien via grille de score en annexe, définition de points-limite précoces et adaptés).

6082. Des études ont montré que le système nerveux périphérique pouvait réguler le système immunitaire (SI) via la libération des neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine, l'adrénaline ou la noradrénaline) lors de la stimulation de nerfs périphériques qui peuvent agir directement sur les cellules du système immunitaire. Il a ainsi été montré que les organes lymphoïdes secondaires reçoivent une innervation importante de nerfs périphériques. Par ailleurs, on peut détecter l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du système immunitaire. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques dans le but de modifier l'activité du système immunitaire est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est déjà utilisée pour le traitement de maladies comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50 000 patients dans le monde sont implantés avec des micro-stimulateurs. Les effets de ces électrostimulations du nerf vague sont actuellement recherchés dans des

maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde. En effet, il a été montré que, dans des modèles d'inflammation chez la souris, l'électrostimulation du nerf vague induit une diminution de la production de cytokines proinflammatoires. Ces études chez la souris ont été la base d'un essai clinique réalisé chez des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde qui ont montré une amélioration significative des scores cliniques des patients traités par électrostimulation du nerf vague. Cependant la stimulation chronique du nerf vague n'est pas sans effet secondaire important. Il est donc nécessaire de trouver d'autres nerfs périphériques conduisant à des effets secondaires moindres.

Dans notre laboratoire, nous avons pu montrer que la stimulation des nerfs spléniques ou du nerf sinuso-carotidien inhibe l'inflammation consécutive à l'injection d'une endotoxine bactérienne, le LPS, chez la souris et notamment la sécrétion de TNF dans le sang. Or le TNF est une cytokine très importante impliquée dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde. Nous cherchons donc dans ce projet à évaluer l'effet de l'électrostimulation de ces nerfs sur le développement de la polyarthrite rhumatoïde dans un modèle murin. Le projet consiste donc à :

- 1- implanter une électrode de stimulation au niveau des nerfs de la rate ou sinuso-carotidien chez la souris ;
- 2- puis induire une polyarthrite rhumatoïde expérimentale ;
- 3- puis suivi ou non par des sessions d'électrostimulation.

La comparaison des scores cliniques entre les animaux ayant subi une électrostimulation des nerfs et ceux n'ayant pas subi cette électrostimulation nous permettra de déterminer l'effet de l'électrostimulation sur le développement de la polyarthrite rhumatoïde. L'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 672. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés.

6083. *Clostridium difficile* est la première cause de diarrhées bactériennes associées aux soins chez l'adulte dans les pays développés et en particulier en France (24 000 cas par an, dont 14 % de formes compliquées). La mortalité associée aux infections à *C. difficile* (ICD) est de l'ordre de 3%. Les ICD représentent un coût sanitaire important pour nos sociétés, en raison de l'augmentation des durées moyennes de séjours et des surcoûts associés à leur prise en charge spécifique.

Trois molécules antibiotiques sont utilisées dans le traitement des ICD ; elles sont généralement efficaces mais chacune de ces traitements présente des inconvénients (échecs de traitement ; risque de sélection de bactéries résistantes ; coût important d'une des molécules). De plus, l'infection à *C. difficile* est caractérisée par un taux de récurrences important (20%), avec parfois des épisodes de récurrences multiples, ce qui peut être très invalidant pour les patients avec une perte en qualité de vie significative. Dans ce contexte, la recherche pour trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques est toujours très active.

La première étape du processus infectieux des ICD est la germination des spores. Les spores sont des formes de résistance particulières de cette bactérie anaérobie stricte qui persistent dans l'environnement, et sont responsables de la contamination des patients. Une fois ingérées, les spores doivent donc germer au niveau colique. Cette étape est cruciale car ce sont les formes issues de cette germination, les formes végétatives, qui vont être responsables des signes cliniques en produisant des toxines. La germination des spores est sous la dépendance d'un ratio entre des acides biliaires activateurs de la germination et des acides biliaires inhibiteurs de la germination. En cas d'altération du microbiote, il est démontré que ce ratio évolue fortement en faveur des acides biliaires activateurs de la germination.

L'acide ursodéoxycholique (UDCA) est un acide biliaire primaire isolé chez l'ours, très hydrophile, présent en très faible quantité chez l'homme. Cette molécule parfaitement tolérée est un médicament largement utilisé dans le traitement de diverses pathologies biliaires et hépatiques non infectieuses. Il a montré récemment que l'UDCA est un puissant inhibiteur de la germination des spores de *C. difficile*. Il est toutefois nécessaire réglementairement de réaliser une évaluation préclinique de son efficacité *in vivo* dans un modèle d'infection chez le hamster qui reproduit les formes les plus graves d'ICD digestives qui sont observées chez l'homme (colite fulminante). L'hypothèse est qu'en saturant le pool des acides biliaires par l'UDCA, la germination des spores de *C. difficile* sera totalement inhibée, même dans un environnement de dysbiose intestinale, et l'infection restera alors asymptomatique.

L'objectif de ce projet est donc d'obtenir une preuve de concept de l'efficacité *in vivo* de cette molécule connue et présentant peu d'effets secondaires, préalable indispensable à des essais cliniques de cette molécule en prévention des ICD.

Toutes les procédures de ce projet ont été conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement).

Remplacement : plusieurs tests *in vitro* ont permis de démontrer au préalable que l'UDCA présente un effet inhibiteur de la germination des spores de *C. difficile*. Le recours à l'animal est néanmoins indispensable pour étudier tous les aspects d'un processus infectieux et valider cette nouvelle recommandation de l'UDCA en contexte infectieux. En effet, il n'existe à ce jour aucun modèle *in vivo* ou *in silico* capable de reproduire la complexité du processus infectieux dans son intégralité.

Réduction : les procédures seront réalisées en plusieurs phases visant à confirmer les propriétés pharmacocinétiques de cette molécule puis l'effet d'une dose importante sur la survenue de l'infection. Les répliques biologiques ne seront réalisés qu'en cas de résultats positifs lors du premier essai d'efficacité. Dans le cas contraire, cette étude sera prématurément arrêtée. Par ailleurs, une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Au total, un nombre maximal de 64 hamsters sera nécessaire pour l'ensemble des procédures de cette étude.

Raffinement : les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux subissent le minimum de stress possible. En particulier, les litières seront changées quotidiennement et les animaux auront un accès direct et illimité à l'eau de boisson et à la nourriture. Toutes les procédures seront



pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques permettant de limiter la souffrance des animaux qui bénéficieront d'une procédure d'euthanasie anticipée et une sortie d'étude prématurée en cas d'atteinte des points limites éthiquement non acceptables.

6084. Pour le développement de nouveaux médicaments, il est nécessaire d'étudier le devenir de la substance active dans l'organisme, déterminer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du composé (ADME), des propriétés qui vont influencer la posologie du médicament (dose administrée et fréquence d'administration).

L'objectif de ce projet est la mesure de la biodisponibilité de produits pharmacologiques en cours de développement, molécules actives ou candidats-médicaments, chez la souris et le rat.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris ou le rat, car ces espèces animales sont les plus utilisées dans le développement de médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et complexe pour permettre d'évaluer la biodisponibilité d'une molécule, qui met en jeu les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules. Pour cette raison, une approche *in vivo* est nécessaire pour déterminer la biodisponibilité des nouveaux candidats-médicaments avant de poursuivre leur développement.

Réduire

Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une mesure efficace de la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Les résultats sont exploités sous la forme de courbes cinétiques. Aucune comparaison statistique n'est requise. La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet ainsi de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Les mesures de pharmacocinétique seront réalisées à l'aide de 3 souris par temps et 8 temps sur une durée de 24h et 2 voies d'administrations, soit 48 souris par composé. Chez le rat, le volume sanguin plus important nous permet de réaliser 3 prélèvements chez le même animal, soit une mesure de la pharmacocinétique d'un candidat-médicament effectuée à l'aide de 16 rats.

Il est prévu de mesurer la biodisponibilité de 25 candidats-médicaments par an chez la souris (1200 souris) et 2 chez le rat (32 rats) sur une période de 5 ans, soit un total de 6000 souris et 160 rats.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris et le rat étant des animaux sociaux, les souris seront maintenues par groupes de 8 et les rats par groupe de 3, dans des cages de grande taille enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

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

6085. Aujourd'hui, le cancer demeure une des causes de mortalité les plus importantes à travers le monde. La mise en place de nouvelles approches thérapeutiques représente donc un enjeu de santé publique majeur.

Une des nouvelles approches développées récemment se base sur la thérapie génique, notamment sur l'utilisation d'adénovirus capable de cibler, infecter, se répliquer et lyser de façon spécifique les cellules tumorales.

Dans le cadre du développement d'une nouvelle thérapie améliorant la réponse anti-tumorale innée des lymphocytes pour le traitement de mélanomes et autres tumeurs solides humaines, dont l'efficacité a pu être démontrée *in vitro* et *in vivo*, nous devons réaliser une étude de sécurité sur 220 hamsters afin d'évaluer et valider les paramètres de toxicologie et de biodistribution de cet adénovirus anticancéreux génétiquement modifié, en préalable d'une future étude clinique.

Au préalable, ce type d'essai réglementaire exige une étape d'optimisation et de validation de méthodes qui nécessitera un maximum de 20 hamsters, soit un total de 460 hamsters pour l'ensemble du projet pour tester deux types de vecteurs. Des études préliminaires ont été déjà réalisées chez l'animal. Ces données obtenues servent de base pour réaliser cette étude réglementaire afin d'effectuer des tests chez l'homme dans un futur proche.

Cette étude répond entièrement à la règle des 3R :

- Remplacement : il s'agit d'un essai réglementaire de sécurité en vue d'essai clinique chez l'homme. Ce type d'étude chez l'animal est obligatoire d'un point de vue légal ; il s'agit d'une exigence des hautes autorités de santé (ANSM, EMA). Dans ce contexte, aucune méthode alternative (*in vitro*) ne peut à ce jour remplacer l'expérimentation animale.

- 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, avec nourriture et eau ad libitum. Toute manipulation invasive sera réalisée sous anesthésie générale ou après euthanasie. L'état général de santé des animaux sera suivi quotidiennement.

Par ailleurs, des points limites sont définis afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'anxiété subie par les animaux au maximum.

6086. Le but de ce projet est d'identifier des marqueurs de consommation d'extraits végétaux pour le compte d'un industriel. Comme il existe très peu de données concernant la composition chimique de ces extraits dans la littérature, nous avons décidé d'utiliser une

approche analytique non ciblée (métabolomique) et de comparer la signature métabolique d'animaux ayant reçu un extrait avec la signature métabolique d'un groupe contrôle.

Nous utiliserons des souris mâles C57Bl/6j âgées de 10 semaines qui, seront placées en cage métabolique (habitation) pendant 24 heures et recevront par gavage intra-gastrique soit le véhicule (glycérol) soit l'un des trois extraits (400 mg/kg de masse corporelle). 24 heures après gavage, les urines seront collectées et le sang cardiaque sera prélevé sous anesthésie générale avant euthanasie.

Il faudra utiliser 10 animaux par groupe pour prendre en compte la variabilité de la réponse, soit un total de 40 animaux.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier le métabolisme d'extraits végétaux à l'échelle d'un organisme. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : pour limiter le stress engendré par le passage en cage à métabolisme, les animaux seront habitués à l'isolement en étant hébergées individuellement en cage conventionnelle enrichie par un nid végétal et un igloo muni d'un plancher. Ce dernier sera transféré en même temps que l'animal dans la cage à métabolisme, afin de procurer un support moins stressant que la grille seule.

6087. Le protocole suivant concerne l'alimentation des chiots et chatons en croissance entre 2 et 18 mois (chiots) et 3 et 12 mois (chatons). Il est réalisé dans le but de s'assurer que les produits chiots et chatons sont bien consommés et bien tolérés sur un plan digestif. Les espèces chien et chat sont les espèces cibles et il n'existe pas de méthode alternative pour étudier cette tolérance digestive.

Un aliment nutritionnellement parfait n'a pas de raison d'être si l'animal refuse de le consommer en quantité suffisante. L'appétence d'un produit lors de sa consommation est donc un critère de sélection primordial lors de l'étude du comportement alimentaire du chiot ou chaton. De même, la compréhension de la nutrition du chiot et chaton nécessite de savoir comment les aliments sont digérés et excrétés et la tolérance digestive est un critère également essentiel à analyser. Le suivi des paramètres sanguins ainsi que des analyses d'urines peuvent également s'avérer nécessaires.

La réalisation de ces évaluations impliquera un maximum de 125 chiots et 125 chatons sur l'ensemble du projet. L'utilisation de chiots et chatons spécifiquement entraînés et adapté à nos installations et faisant l'objet d'un suivi très régulier permet de réduire significativement le nombre d'individu nécessaire.

Les chiots et chatons participants à ce projet suivent des programmes spécifiques d'entraînement, d'éducation, de socialisation et d'activités quotidiennes. Ces programmes permettent d'optimiser le bien-être de nos animaux. Aucune mesure antalgique n'est nécessaire puisque la contrainte est faible (procédures de classe légère avec aucune douleur ni aucune souffrance mentale ou physique).

6088. Dans les pays occidentaux, le nombre de personnes en surpoids ou obèse est en constante augmentation et est associé à l'accroissement des maladies métaboliques et cardiovasculaires. Ce problème sociétal est lié 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 aux états d'obésité comme l'altération de la barrière intestinale, du microbiote, du métabolisme des lipides et réduire l'instauration d'une inflammation. Ainsi, la quantité et la qualité des lipides alimentaires sont impliqués dans les effets métaboliques pouvant être observés.

Les lipides présents dans les produits laitiers sont une source non négligeable de lipides ingérés par l'Homme. Ils constituent ce que l'on appelle la matière grasse laitière. Les lipides laitiers présentent une variété et une richesse unique en différents lipides que l'on trouve dans l'ensemble des produits laitiers. Les études menées à ce jour sur la consommation de matière grasse laitière ne révèlent aucun effet néfaste, voire à l'inverse des effets positifs.

Les objectifs du projet sont de montrer que la matière grasse laitière et plus spécifiquement la sphingomyéline laitière (lipide bioactif d'intérêt qui est présent spécifiquement dans la matière grasse laitière) sont impliquées dans des effets bénéfiques sur la barrière intestinale et la modulation de l'inflammation. Dans ce but, une étude chronique et une étude aigüe seront réalisées.

L'étude chronique permettra d'évaluer l'impact à long terme des lipides polaires laitiers. Ce paramètre est important puisque la matière grasse laitière représente une part non négligeable de notre alimentation quotidienne. Dans cet objectif, 60 souris C57Bl/6J réparties en 4 groupes recevront pendant 8 semaines différents régimes alimentaires : un témoin, un régime hyperlipidique et deux autres régimes hyperlipidiques enrichis avec différentes concentrations de lipides laitiers. Le régime hyperlipidique est connu pour induire une modification de perméabilité intestinale et l'établissement d'une réponse inflammatoire à bas bruit. L'hypothèse de travail est que les lipides polaires laitiers peuvent contrebalancer l'effet d'un régime hyperlipidique en améliorant ces paramètres.

L'ensemble des souris seront euthanasiées après les 8 semaines de régimes suite à un prélèvement sanguin terminal réalisé sous anesthésie profonde gazeuse et sans réveil. La perméabilité intestinale sera évaluée par un test de perméabilité classique utilisé régulièrement.

Pour la deuxième partie de notre protocole, nous souhaitons préciser le(s) mécanisme(s) d'action impliqué(s) mis en évidence par l'étude chronique en ciblant l'action de la sphingomyéline. Dans ce but, une étude aigüe avec 50 souris C57Bl/6J réparties en 5 groupes sera réalisée. Elles recevront chacune en une fois soit le témoin soit des lipides polaires ou de la sphingomyéline à deux doses différentes. Pour répondre à nos problématiques, un prélèvement sanguin en veine porte et en intracardiaque sous anesthésie gazeuse profonde et sans réveil seront effectués.

Ce projet respecte les lignes directrices internationales et sont conformes aux règles éthiques en vigueur.

L'établissement de ce projet *in vivo* et les doses de lipides polaires laitiers et de sphingomyéline choisies sont en adéquation avec les études cellulaires réalisées au laboratoire et l'alimentation quotidienne.

Afin d'exploiter au maximum cette étude, une banque de données des différents prélèvements recueillis sera réalisée pour éventuellement répondre à de nouvelles problématiques et limiter l'utilisation des animaux.

Un total de 110 souris sera utilisé dans le cadre de ce projet. Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum.

Pour leur bien-être, leur comportement social sera stimulé par une stabulation collective (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 vu des études précédentes, sur 8 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. Les solutions de gavages sont également non néfastes pour les souris.

6089. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur primaire du foie la plus fréquente dont le pronostic reste très sombre avec un taux de survie à cinq ans n'excédant pas 20%. Les facteurs étiologiques principaux, dans les pays occidentaux, sont l'abus d'alcool, les infections chroniques par le virus de l'hépatite C et plus récemment l'obésité devenue un problème de santé majeure de par nos récents changements de vie (alimentation plus riche, sédentarité). En thérapie ciblée, seul le sorafénib est proposé avec une efficacité qui reste très modeste, seulement de quelques mois. Afin de proposer de nouvelles thérapies il est crucial de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans ces cancers. Cette expérimentation chez l'animal est nécessaire de par la complexité des relations entre les différents types cellulaires existant au sein d'une tumeur qui ne peut être reproduite par des approches *in vitro*. Concernant, la tumorigenèse hépatique, plusieurs modèles murins de cancer du foie ont été développés qui ont été riches d'enseignements : ils ont notamment permis entre autre d'identifier des mutations d'un oncogène qui ont ensuite été retrouvées dans des CHC humains. Ce résultat a été très important car les mutations de ce gène sont l'un des principaux événements retrouvés dans le développement du CHC chez l'homme. L'objectif de notre projet est de décrypter les mécanismes moléculaires de la tumorigenèse hépatique résultant de mutations de ce gène afin d'identifier des approches thérapeutiques. Les tumeurs hépatiques porteuses de mutations de ce gène seront induites chimiquement chez la souris suivant un protocole bien décrit. Nous analyserons le rôle d'un gène suppresseur de tumeur que nous avons récemment identifié comme un acteur potentiel de cette tumorigenèse qui de façon surprenante serait requis pour le développement tumoral et aurait donc un rôle pro-oncogénique. Afin de tester cette hypothèse, une délétion génétique de ce gène suppresseur de tumeur sera réalisée soit avant le traitement chimique afin d'étudier son rôle dans l'initiation du processus tumoral, soit une fois que la tumeur aura été détectée par échographie, afin d'étudier son rôle dans la progression tumorale. Le suivi tumoral sera réalisé par échographie.

Ce projet prévu sur 3 ans utilisera 45 souris. Pour respecter la règle des 3R, les procédures expérimentales nécessaires à ce projet ont été réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux tout en permettant de réaliser une étude statistique valable. Ceci est possible grâce à l'imagerie par échographie qui permet un suivi longitudinal du développement tumoral. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance régulière et l'imagerie sera réalisée sous anesthésie générale.

A terme, ce projet permettra de mieux comprendre le développement du cancer du foie et devrait permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour ce type de tumeurs qui restent actuellement toujours incurables.

6090. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur primaire du foie la plus fréquente dont le pronostic reste très sombre avec un taux de survie à cinq ans n'excédant pas 20%. Les facteurs étiologiques principaux, dans les pays occidentaux, sont l'abus d'alcool, les infections chroniques par le virus de l'hépatite C et plus récemment l'obésité devenue un problème de santé majeure de par nos récents changements de vie (alimentation plus riche, sédentarité). En thérapie ciblée, seul le sorafénib est proposé avec une efficacité qui reste très modeste, seulement de quelques mois. Afin de proposer de nouvelles thérapies il est crucial de décrypter les mécanismes moléculaires impliqués dans ces cancers. Cette expérimentation chez l'animal est nécessaire de par la complexité des relations entre les différents types cellulaires existant au sein d'une tumeur qui ne peut être reproduite par des approches *in vitro*.

Concernant, la tumorigenèse hépatique, plusieurs modèles murins de cancer du foie ont été développés qui ont été riches d'enseignements : ils ont notamment permis entre autre d'identifier des mutations d'un oncogène qui ont ensuite été retrouvées dans des CHC humains. Ce résultat a été très important car les mutations de ce gène sont l'un des principaux événements retrouvés dans le développement du CHC chez l'homme. L'objectif de notre projet est de décrypter les mécanismes moléculaires de la tumorigenèse hépatique résultant de mutations de ce gène afin d'identifier des approches thérapeutiques. Les tumeurs hépatiques porteuses de mutations de ce gène seront induites, chez la souris, chimiquement suivant un protocole bien décrit. Nous analyserons le rôle d'un gène suppresseur de tumeur que nous avons récemment identifié comme un acteur potentiel de cette tumorigenèse qui de façon surprenante serait requis pour le développement tumoral et aurait donc un rôle pro-oncogénique. Afin de tester cette hypothèse, une délétion génétique de ce gène suppresseur de tumeur sera réalisée soit avant le traitement chimique afin d'étudier son rôle dans l'initiation du processus tumoral, soit une fois que la tumeur aura été détectée par échographie, afin d'étudier son rôle dans la progression tumorale. Le suivi tumoral sera réalisé par échographie.

Ce projet prévu sur 3 ans utilisera 45 souris. Pour respecter la règle des 3R, les procédures expérimentales nécessaires à ce projet ont été réfléchies afin de minimiser le nombre d'animaux tout en permettant de réaliser une étude statistique valable. Ceci est possible grâce à l'imagerie par échographie qui permet un suivi longitudinal du développement tumoral. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance régulière et l'imagerie sera réalisée sous anesthésie générale.

A terme, ce projet permettra de mieux comprendre le développement du cancer du foie et devrait permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour ce type de tumeurs qui restent actuellement toujours incurables

6091. Les maladies cardiovasculaires tuent en moyenne 4 millions de personnes en Europe chaque année. Parmi ces maladies, on retrouve l'ischémie critique du membre inférieur (ICMI). En France on recense 500 à 1000 nouveaux patients souffrant de cette pathologie par an. L'athérosclérose est la cause principale de l'ICMI : les artères du membre inférieur sont obstruées par une plaque d'athérome provoquant une diminution du flux sanguin en aval. Par conséquent l'apport en oxygène dans les tissus est totalement restreint et des troubles trophiques (ulcères, nécrose) apparaissent au risque de compromettre la survie du membre inférieur.

Malgré l'amélioration des traitements médicamenteux et des techniques de revascularisation chirurgicale et interventionnelle, le pronostic de ces patients reste grave et les décès ou complications post-opératoires sont fréquents. L'exploration de nouvelles stratégies de revascularisation non invasive semble donc nécessaire.

Ces dernières années, plusieurs essais cliniques ont montré que l'injection de cellules souches dérivées du sang chez des patients atteints d'ICMI avait un effet bénéfique sur leur qualité de vie et la perfusion des artères malades. Des études récentes sur des modèles murins de pathologies cardiovasculaires, ont révélé que les cellules souches humaines dérivées de tissu adipeux (ADSC) ou les vésicules extracellulaires (EV) secrétées par ces cellules, ont un potentiel régénératif vasculaire.

Notre projet a pour but de développer une nouvelle thérapie cellulaire en vue de traiter un modèle d'ischémie critique du membre inférieur (ICMI) chez le lapin. Le lapin possède une vascularisation relativement proche de l'Homme et la taille de ses membres inférieurs nous permettra de visualiser plus facilement l'effet fonctionnel de la thérapie.

La méthode envisagée pour induire l'ischémie critique, par injection de microbilles, est couramment utilisée chez l'Homme pour limiter l'afflux sanguin dans le développement des tumeurs. Cette technique est moins invasive que la chirurgie classique (excision de l'artère fémorale) et la récupération après l'intervention sera probablement meilleure.

Cette procédure sera réalisée sous anesthésie générale. Dans un souci de bien-être, les animaux auront reçu un patch analgésique dès le début de la procédure pour éviter toute douleur. Un autre patch leur sera administré en cas de signes de souffrance.

La thérapie sera composée de cellules ADSC ou de EV. Pour cela nous injecterons ces traitements dans les muscles de la patte ischémisée et évaluerons leurs effets principalement par l'observation clinique mais aussi par des techniques d'imageries (angiographie, écho-doppler et IRM).

Le suivi des animaux s'effectuera sur 5 semaines. Ces procédures expérimentales ont été particulièrement optimisées afin d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

La surveillance de chaque animal par les techniciens animaliers et par le vétérinaire, ainsi que les évaluations complémentaires, sont susceptibles d'être renforcées à titre individuel en cas de phénomène intercurrent ou de points limite atteint.

A la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort sous anesthésie générale.

Un total de 100 lapins mâles New-Zealand est prévu.

Ainsi, les résultats qu'apportera ce projet permettront de confirmer ou d'infirmer l'effet de notre thérapie sur le traitement dans le modèle d'ICMI chez le lapin. S'ils s'avèrent positifs, nous confirmerons l'effet thérapeutique des ADSC et VE par une expérimentation chez le porc avant le passage à l'essai clinique chez l'homme.

6092. Les maladies cardiovasculaires tuent en moyenne 4 millions de personnes en Europe chaque année. Parmi ces maladies, on retrouve l'ischémie critique du membre inférieur (ICMI). En France on recense 500 à 1000 nouveaux patients souffrant de cette pathologie par an. L'athérosclérose est la cause principale de l'ICMI : les artères du membre inférieur sont obstruées par une plaque d'athérome provoquant une diminution du flux sanguin en aval. Par conséquent l'apport en oxygène dans les tissus est totalement restreint et des troubles trophiques (ulcères, nécrose) apparaissent au risque de compromettre la survie du membre inférieur.

Malgré l'amélioration des traitements médicamenteux et des techniques de revascularisation chirurgicale et interventionnelle, le pronostic de ces patients reste grave et les décès ou complications post-opératoires sont fréquents. L'exploration de nouvelles stratégies de revascularisation non invasive semble donc nécessaire. Ces dernières années, plusieurs essais cliniques ont montré que l'injection de cellules souches dérivées du sang chez des patients atteints d'ICMI avait un effet bénéfique sur leur qualité de vie et la perfusion des artères malades. Des études récentes sur des modèles murins de pathologies cardiovasculaires, ont révélé que les cellules souches humaines dérivées de tissu adipeux (ADSC) ou les vésicules extracellulaires (EV) secrétées par ces cellules, ont un potentiel régénératif vasculaire.

Notre projet a pour but de développer une nouvelle thérapie cellulaire en vue de traiter un modèle d'ischémie critique du membre inférieur (ICMI) chez le lapin. Le lapin possède une vascularisation relativement proche de l'Homme et la taille de ses membres inférieurs nous permettra de visualiser plus facilement l'effet fonctionnel de la thérapie.

La méthode envisagée pour induire l'ischémie critique, par injection de microbilles, est couramment utilisée chez l'Homme pour limiter l'afflux sanguin dans le développement des tumeurs. Cette technique est moins invasive que la chirurgie classique (excision de l'artère fémorale) et la récupération après l'intervention sera probablement meilleure. Cette procédure sera réalisée sous anesthésie générale. Dans un souci de bien-être, les animaux auront reçu un patch analgésique dès le début de la procédure pour éviter toute douleur. Un autre patch leur sera administré en cas de signes de souffrance.

La thérapie sera composée de cellules ADSC ou de EV. Pour cela nous injecterons ces traitements dans les muscles de la patte ischémisée et évaluerons leurs effets principalement par l'observation clinique mais aussi par des techniques d'imageries (angiographie, écho-doppler et IRM).

Le suivi des animaux s'effectuera sur 5 semaines. Ces procédures expérimentales ont été particulièrement optimisées afin d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants.

La surveillance de chaque animal par les techniciens animaliers et par le vétérinaire, ainsi que les évaluations complémentaires, sont susceptibles d'être renforcées à titre individuel en cas de phénomène intercurrent ou de point limite atteint.

A la fin de l'étude, les animaux seront mis à mort sous anesthésie générale.

Un total de 100 lapins mâles New-Zealand est prévu.

Ainsi, les résultats qu'apportera ce projet permettront de confirmer ou d'infirmer l'effet de notre thérapie sur le traitement dans le modèle d'ICMI chez le lapin. S'ils s'avèrent positifs, nous confirmerons l'effet thérapeutique des ADSC et VE par une expérimentation chez le porc avant le passage à l'essai clinique chez l'homme.

6093. Dans le cadre de ses activités de recherche pour l'industrie pharmaceutique, notre entreprise recherche des molécules pour traiter les pathologies auto-immunes comme par exemple l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques et le psoriasis. Les molécules agissant sur les cibles d'intérêts sont sélectionnées en fonction de leurs activités dans des tests cellulaires *in vitro* et de leurs paramètres pharmacocinétiques.

Nous mettons en place un processus de screening des molécules *via* des tests cellulaires ou non-cellulaires *in vitro*. Ces tests permettent de réduire le nombre de composés à tester ultérieurement chez l'animal mais ne permettent malheureusement pas de se passer des modèles animaux.

Les composés présentant le potentiel le plus intéressant sont testés sur des modèles animaux relevant de pathologies humaines de maladies auto-immunes qui touchent de plus en plus de patients et pour lesquelles il faut mettre au point des traitements efficaces qui font cruellement défaut. Les procédures expérimentales de ce projet rassemblent plusieurs tests de screening différents, elles sont de courtes durées (de 5 à 15 jours) et les animaux ne développent pas de signes cliniques. Compte tenu de l'expérience acquise dans ce domaine, nous prévoyons d'utiliser environ 10 000 animaux sur 5 ans (8 650 souris et 1 350 rats). Seuls les modèles animaux nous paraissant humainement acceptables sont réalisés.

Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux et des moyens antalgiques appropriés sont utilisés.

6094. La fibrose pulmonaire est une pathologie qui conduit à un dysfonctionnement des organes et une insuffisance respiratoire, ceci a un impact considérable sur la qualité de vie. Malgré une avancée majeure dans ce domaine, il est nécessaire d'améliorer davantage nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la fibrose pulmonaire, afin d'améliorer le management thérapeutique de cette pathologie ainsi que la qualité de vie des patients. Plusieurs facteurs peuvent causer la fibrose pulmonaire, entre-autre les traitements anti-cancéreux (la radiothérapie et la chimiothérapie). En effet le traitement des cancers par chimiothérapie (comme la bléomycine) induit une toxicité au niveau pulmonaire se traduisant par une fibrose interstitielle, cette toxicité conduit systématiquement à la diminution au à l'arrêt de l'administration de la chimiothérapie pour les patients. Des études ultérieures avaient bien mis en évidence les facteurs cellulaire et moléculaire impliqués dans la fibrogenèse et qui sont le fibroblaste et le TGFb1 respectivement. Cependant, des études récentes ont suggéré un rôle des macrophages en tant que régulateurs cellulaires critiques de la fibrose pulmonaire et en particulier les macrophages polarisés M2 qui produisent de grandes quantités de TGFb1. De manière intéressante, il a été démontré que la fibrose pulmonaire induite par bléomycine est souvent associée à une importante infiltration de macrophages polarisés M2.

L'objectif de ce projet est de développer des cibles thérapeutiques potentielles pour prévenir le développement de la fibrose pulmonaire induite par bléomycine.

La chimiothérapie engendre des effets secondaires sévères aux niveaux des tissus sains comme la fibrose, provoquant ainsi la perte de fonction de l'organe touché. Une avancée importante dans ce domaine va permettre d'améliorer la qualité de vie des patients et un meilleur management de leurs cancers.

Afin de pouvoir comprendre la pathologie de fibrose et proposer des solutions thérapeutiques, le recours à l'utilisation d'un modèle animal (organisme vivant entier) est nécessaire et indispensable du fait que la fibrose est un processus physiopathologique qui implique plusieurs composantes cellulaires et moléculaires.

Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique *a priori* a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives et qui permet de réduire au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 442 souris. Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. En effet, l'induction de fibrose par bléomycine sera pratiquée par injection intrapéritonéale sous anesthésie locale, afin de réduire au minimum la souffrance et l'angoisse des animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. L'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Une pesée sera effectuée régulièrement. Les points limites seront strictement appliqués.

6095. La dyskinésie ciliaire primitive (DCP) est une maladie génétique caractérisée par des infections respiratoires ORL et bronchiques débutant dès la naissance. Malgré les traitements conventionnels, cette maladie aboutit à la destruction progressive des poumons et à l'insuffisance respiratoire. La DCP est l'affection congénitale des voies respiratoires la plus fréquente après la mucoviscidose. Le travail de recherche consiste à évaluer la tolérance et l'efficacité d'une thérapie génique sur un modèle de souris déficiente, porteuse d'une mutation spontanée dans un gène de la DCP. Cette souris est susceptible de faire des infections respiratoires récidivantes qui sont essentiellement localisées au niveau des sinus, avec peu d'infections bronchiques comparé à

l'Homme. Les cils des cellules épithéliales respiratoires de ces souris sont immobiles, il est donc possible d'observer l'effet d'une thérapie génique sur la motricité des cils et sur les infections.

Les souris recevront un traitement sous anesthésie générale et seront observées selon 2 groupes entre 48h et 2 semaines, avant les prélèvements finaux pour visualiser les effets de ce traitement. La recherche de douleur et/ou de difficulté respiratoire liée à la maladie sera faite et traitée au besoin.

2) Retombées attendues dans le domaine de la Dyskinésie Ciliaire : cette étude est un essai thérapeutique avec des nanovecteurs non viraux sur un modèle de souris qui nous permettra d'évaluer la tolérance du traitement et son efficacité à corriger cette maladie ce qui ouvrirait des espoirs de traiter efficacement les malades. La durée attendue de cette étude est de 2 ans.

3) Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Nous avons démontré précédemment que cette méthode de thérapie génique est efficace *in vitro* sur culture cellulaire. Nous devons maintenant démontrer que ce traitement est efficace et tolérable sur un organisme entier. Il existe d'autres modèles (souris mutantes et chien) qui sont atteints de la même maladie que l'homme. Nous avons choisi ce modèle de souris car elles présentent le moins de signes graves de cette maladie génétique (en particulier, ce modèle ne souffre pas de gonflement de la tête ou hydrocéphalie).

Le nombre de souris a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Le nombre total de souris inclus dans le projet est de 50.

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

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent une classification de gravité des procédures expérimentales en classe de gravité modérée.

6096. Notre société développe des vaccins thérapeutiques destinés aux patients atteints de cancer. Ils sont basés sur une technologie innovante qui vise à rendre les cellules tumorales sensibles au système immunitaire du patient en lui administrant un vaccin. Le vaccin est composé d'un peptide (petite protéine) dite « immunogène » c'est-à-dire capable d'induire une réponse immunitaire qui sera spécifiquement dirigée contre un déterminant (appelé un épitope) des cellules tumorales, cet épitope naturellement exprimé par les cellules tumorales mais trop peu pour générer une réponse immunitaire efficace par lui-même est donc qualifié de « non immunogène » ou de « cryptique ».

Tous les travaux menés par notre société vise donc à choisir le bon couple composé d'un vaccin efficace (appelé peptide optimisé) et d'un peptide cible « cryptique » faiblement présenté à la surface des cellules tumorales donc non immunogène mais qui sera reconnu par les cellules immunitaires induites par la vaccination avec le peptide optimisé. L'efficacité de nos produits est par ailleurs liée à l'expression par le patient vacciné, d'un déterminant particulier du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (ou CMH). Le CMH est l'équivalent pour les tissus du système ABO pour le système sanguin, et est notamment impliqué dans la tolérance ou le rejet des greffes. Chaque individu exprime un certain nombre de déterminants du CMH plus ou moins fréquents qui doivent correspondre à ceux qui sont ciblés par le vaccin.

Notre portefeuille clinique se compose actuellement de 2 vaccins : le premier est composé d'un peptide qui cible la télomérase (protéine impliquée dans l'immortalité des cellules tumorales) actuellement en essai clinique de phase IIb. L'autre est un produit de seconde génération composé d'un polypeptide, actuellement en essai clinique de phase I, et qui cible trois antigènes de tumeurs universels. Ces 2 vaccins sont destinés aux patients exprimant la molécule du CMH la plus fréquente, HLA-A\*0201 qui est exprimé par 45% de la population. Afin de limiter le risque d'échappement tumoral, chaque tumeur exprimant des épitopes différents, nous souhaiterions identifier de nouvelles cibles dans le contexte HLA-A\*0201.

La recherche de couples de peptide optimisé (vaccin) et de peptide cryptique (également nommé peptide « natif » car naturellement présent à la surface des cellules tumorales) se fait en plusieurs étapes. Un gros travail amont de design *in silico* puis de test cellulaires *in vitro* permet d'éliminer un grand nombre de peptides candidats (plus d'un quart suivant notre expérience) qui ne présentent pas les caractéristiques requises (peptide optimisé non immunogène, peptide natif immunogène, etc.). Pour les couples répondant aux critères requis, la dernière étape de validation est l'évaluation qualitative et quantitative de la réponse immunitaire générée. Pour cela, des tests *in vivo* sont inévitables pour déterminer parmi les candidats restants, ceux qui seront le plus à même de générer la meilleure réponse immunitaire chez l'homme ; ces tests sont réalisés à l'aide d'un modèle de souris transgéniques, exprimant le déterminant humain ciblé, dans ce cas la molécule HLA-A\*0201. Les souris sont vaccinées dans les mêmes conditions que chez l'homme ce qui permet d'évaluer la capacité d'un vaccin candidat à induire une réponse immunitaire la plus forte et la plus spécifique possible. Ces tests permettent également de confirmer la reconnaissance des cellules tumorales exprimant l'épitope cryptique par les cellules immunitaires stimulées par le peptide optimisé. Cette étape appelée « cross-reconnaissance » est cruciale pour l'efficacité du vaccin. Dans un souci de raffinement, les souris seront en cages collectives, lors de l'immunisation un massage sera effectué au point d'injection pour éviter l'accumulation local du produit qui pourrait être douloureux, en cas de plaie apparente un traitement quotidien de Bétadine sera appliqué.

Nous disposons d'un modèle de souris transgéniques exprimant la molécule HLA-A\*0201 humaine (les souris HHD-DR3), cependant ce modèle présente de nombreuses difficultés de reproduction. Pour s'affranchir de ce problème nous testerons deux autres modèles que sont les Jax AAD et les Taconic 9659, toutes deux exprimant la molécule chimérique HHD. Avant de débiter la sélection des peptides d'intérêts, nous commencerons par comparer chez ces 3 modèles les réponses obtenues à trois de nos peptides

présentant soit une réponse forte, modérée ou faible chez le modèle que nous utilisons actuellement. A l'issue de cette expérience, nous choisirons l'un des modèles pour la sélection de nos nouveaux candidats.

Nous avons désigné une trentaine de peptides, seules 20 sont retenus pour les études *in vivo*. Lorsque nous aurons sélectionné 3 couples peptide optimisé/peptide cryptique natif, un seul schéma de vaccination sera testé. L'approche expérimentale utilisée *in vivo* ainsi que l'ensemble des travaux en amont *in silico* puis *in vitro* permettent finalement de réduire le nombre de souris de 450 souris à 300 souris, qui sera le nombre de souris utilisées pour ce projet.

6097. Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. L'objectif de ce projet est de réaliser les études de cancérogénèse permettant d'évaluer la possibilité, pour des candidats médicaments, de provoquer la formation de tumeurs avant leur mise sur le marché, selon les lignes directrices en vigueur. Ce projet consiste à tester l'efficacité de 16 composés. Les tests de sécurité envisagés sont très importants avant d'utiliser ces molécules dans l'espèce humaine.

Le projet, d'une durée de 5 ans, utilisera un maximum de 11488 souris (16 études de 26 semaines impliquant 718 animaux par étude) répartis dans des lots traités avec le composé chimique, à différentes doses, un ou plusieurs lots témoins pour comparer les effets du composé et voire des véhicules utilisés pour le formuler, ainsi que un ou plusieurs lots traités avec un contrôle positif cancérogène.

Le nombre d'animaux utilisé est adapté à la nécessité d'évaluation des résultats sur un effectif suffisant, adapté à l'incidence parfois faible des différents types de tumeurs observables.

Les animaux seront hébergés en groupe ou individuellement avec une justification scientifique et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter toute souffrance et pour optimiser le bien-être des animaux.

6098. Chez l'homme, lors d'une infection grave ou d'une chirurgie majeure, le système immunitaire va rapidement présenter des signes de dysfonctionnement. Cette altération du système de défense contre les infections est à l'origine du risque de développer des infections secondaires ou acquises à l'hôpital (infections nosocomiales). Il n'existe malheureusement pour le moment pas de traitement permettant une restauration des fonctions immunitaires lors d'un séjour en réanimation et les patients développent des infections nosocomiales, à l'origine d'une augmentation de la mortalité.

Afin d'étudier ces perturbations du système immunitaire, nous aimerions développer un modèle d'immunodépression acquise après infection abdominale chez des souris : une première infection abdominale chirurgicale agira comme le facteur déclenchant de l'immunodépression. Cette infection abdominale sera traitée par antibiotiques et n'entraînera pas la mort de l'animal mais sera à l'origine d'une immunodépression. Cette immunodépression sera caractérisée par l'étude du système immunitaire ainsi que par le développement d'une seconde infection, une semaine après la première, mimant ainsi la survenue d'une infection nosocomiale.

Ce projet permettra de maîtriser et caractériser un modèle d'immunodépression afin d'étudier des thérapeutiques immunomodulatrices, étape indispensable avant d'éventuelles études chez les patients.

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

1. Remplacement: le développement d'un modèle de dysfonctionnement du système immunitaire nécessite d'une part une infection ou une chirurgie comme facteur déclenchant et, d'autre part, l'accès aux organes d'intérêt pour évaluer les conséquences de cette immunodépression. Ceci n'est absolument pas reproductible *in vitro* et c'est pourquoi le recours à des animaux est indispensable pour le développement de ce type de modèle.

2. Réduction: Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet sera de 360 souris.

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

6099. Les leucémies aiguës posent des problèmes spécifiques concernant les techniques de préservation de la fertilité féminine, car les perturbations hématologiques et le caractère urgent de la chimiothérapie d'induction ne permettent pas une démarche de préservation des ovocytes ou de tissu ovarien au moment du diagnostic. Il est possible de proposer une cryoconservation d'ovocytes matures après stimulation ovarienne dans les suites des cures d'induction, après sortie d'aplasie dès que la patiente va mieux. Cependant, les risques génotoxiques sur l'ADN ovocytaire des follicules en croissance des cures d'induction à base de cytarabine et de daunorubicine (molécules données en première ligne) sont actuellement inconnus.

Modèle d'étude et objectifs du projet: Nous travaillerons sur des ovocytes de souris, en raison de leur similitude avec les ovocytes humains et du fait de l'impossibilité éthique et pratique d'obtenir des ovocytes matures humains pour la recherche. Des souris seront exposées à la cytarabine ou à de la daunorubicine, puis seront stimulées de façon similaire aux protocoles de stimulation ovarienne réalisés chez les femmes qui veulent faire conserver leurs ovocytes. Nous pourrions ainsi étudier, dans un premier temps, la cytotoxicité ovarienne et le risque génotoxique induits sur les ovocytes matures de souris en fonction du stade de développement atteint par les follicules ovariens au moment où ils étaient exposés aux agents de chimiothérapie. Dans un deuxième temps, nous réaliserons également une étude du risque de transmission à l'embryon préimplantatoire des lésions d'ADN induites au niveau de l'ovocyte par les agents de chimiothérapie.

Résultats attendus: 1- Evaluation du risque génotoxique de conserver des ovocytes matures chez des patientes atteintes de leucémie et pour lesquelles les ovocytes ont été exposés auparavant à une première ligne de chimiothérapie d'induction par cytarabine et daunorubicine. 2- Etude des phénomènes de réparation ovocytaire après fécondation et les risques de transmission de dommages à l'ADN à l'embryon préimplantatoire.

Nos travaux se dérouleront dans le respect de la règle des 3 R: réduction à son minimum du nombre d'animaux tout en obtenant des résultats significatifs, et, chaque fois que cela sera possible, le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro*. De plus, ces études seront donc réalisées de manière séquentielle pour déterminer l'action de ces composés sur les ovocytes puis sur l'embryon. Durant l'ensemble de ces procédures, afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement. Cette étude fera appel dans son ensemble au maximum à 694 souris de la souche CD1.

6100. Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Le dépistage permet de détecter d'éventuelles anomalies très tôt augmentant ainsi grandement l'efficacité des traitements et les chances de guérisons. En revanche ces chances diminuent en cas de diagnostics tardifs, en particuliers dans le cas des tumeurs invasives avec atteinte ganglionnaires.

Nous avons développé différents systèmes d'analyse cellulaires permettant d'évaluer les capacités invasives des cellules tumorales dans différentes conditions et dans différents composants mimant les tissus environnementaux présents dans la glande mammaire. Ces essais sont utilisés en priorité afin de mieux définir les paramètres de la progression tumorale et de l'invasion par les cellules cancéreuses, notamment leur capacité à dégrader leur environnement facilitant leur dissémination au cours du processus métastatique.

Cependant la complexité des processus mis en jeu *in vivo* ne peut pas encore être reproduite dans des systèmes reconstitués *in vitro*. C'est pourquoi nous devons valider nos hypothèses et conclusions basées sur l'observation des cellules tumorales en culture en utilisant des modèles animaux. Le programme invasif des cancers du sein peut être ainsi reproduit dans des conditions les plus proches de l'évolution d'une tumeur chez la femme.

Le suivi du mouvement des cellules tumorales et de certaines protéines impliquées de façon essentielle dans l'invasion tumorale, ainsi que les changements de conformation de l'environnement se feront grâce au positionnement de l'animal sous un microscope adapté. Ce type d'imagerie n'entraîne pas de souffrance et l'animal est anesthésié.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et pouvoir suivre la progression d'une même tumeur au cours du temps nous développons une technique chirurgicale de pose de fenêtre d'observation au niveau des glandes mammaires étudiées. Ainsi une même tumeur pourra être analysée plusieurs fois au cours du temps sur un même animal. Dans ce projet le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est évalué à 297 souris.

Toutes les précautions seront donc prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur des résultats obtenus, ainsi que pour limiter la souffrance et le stress des animaux (anesthésie, soins opératoires et post opératoires, suivi particulier des animaux opérés à l'animalerie...). Comme il s'agit d'étudier les étapes précoces de l'invasion tumorale, les expériences sont arrêtées avant la souffrance des animaux, avant que la tumeur primaire ne soit trop importante et avant apparition de métastases.

Ce projet contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'évolution de la tumeur du sein tant au niveau cellulaire que du microenvironnement. Ce qui permet d'obtenir des données pouvant être utilisées pour le diagnostic précoce et améliorer les traitements existants dans les cancers du sein.

6101. Les maladies inflammatoires chroniques des intestins (MICI) regroupent toutes les conditions d'inflammation ou de réponse immunitaire de l'intestin chroniques ou récurrentes. Les deux MICI plus courantes sont la colite ulcéreuse ou rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn.

Les MICI sont des maladies très invalidantes caractérisées par une inflammation de la paroi du tube digestif, qui provoquent une dégradation importante de la qualité de vie des patients.

Dans la maladie de Crohn, l'inflammation peut être située tout au long du tube digestif mais est plus fréquemment limitée à l'intestin. En revanche, dans le cas de la rectocolite hémorragique, l'inflammation est plus particulièrement localisée au niveau du rectum et du côlon. Le mécanisme d'apparition de ces maladies est variable en fonction des patients, mais en général, ces maladies se manifestent par des poussées inflammatoires se traduisant par une sécrétion locale du TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) de durée et de fréquence variables.

L'objectif de ce projet est l'évaluation des propriétés immunomodulatrices, de l'efficacité et des effets secondaires de(s) nouveau(x) candidat(s)-médicament(s) des laboratoires académiques et pharmaceutiques visant à améliorer la qualité de vie des patients souffrant de MICI.

Les modèles animaux des MICI sont des outils précieux et indispensables. Ils offrent un large éventail d'options pour étudier l'implication de divers facteurs (dont la composante immunologique) dans la pathogénie des MICI et ils permettent d'évaluer les différentes solutions thérapeutiques.

Les modèles animaux de colite intestinale sont classés selon plusieurs critères. Les modèles de colites chimio-induites sont répartis en deux classes : ceux induisant un déséquilibre de la barrière intestinale (modèle de DSS: Dextran Sulfate Sodium) et ceux qui provoquent une réaction d'hypersensibilité induite par l'utilisation d'un haptène (Oxazolone ou TNBS: acide trinitrobenzène sulfonique).

La colite expérimentale provoquée par le DSS, est l'un des modèles de l'inflammation de côlon chez les rongeurs les plus fréquemment utilisés. C'est un modèle reconnu pour les affections inflammatoires humaines comme la maladie de Crohn et la colite



ulcéreuse. Les souris seront sélectionnées selon des critères d'inclusion comme le pourcentage de cellules humaines présentes dans la circulation. Les souris seront ensuite exposées au DSS dans l'eau de boisson afin qu'elles développent une inflammation du côlon, présentant des symptômes comme la diarrhée, des saignements rectaux, la détérioration des cellules constituant la barrière intestinale et une importante infiltration des cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale ainsi qu'une perte de poids.

La colite aiguë peut être induite par un seul cycle d'exposition des souris au DSS (4 à 7 jours), alors que de multiples cycles d'administration de DSS provoqueront une colite chronique.

#### REMPLACEMENT:

Les Maladies inflammatoires du colon sont la résultante d'une interaction entre différentes cellules immunitaires et les cellules épithéliales qui constituent le colon. A ce jour, il n'est pas encore possible de modéliser ces interactions ou de les étudier *in vitro*. Dès lors, la souris humanisée constitue le seul modèle valable, robuste et prédictif pour la mise au point de nouveaux médicaments.

#### REDUCTION:

Dans ce projet, des souris humanisées (n=700) et non humanisées (n=300) seront utilisées.

Chaque étude préclinique visant à tester l'efficacité d'un candidat médicament nécessite entre 50 et 100 animaux (Au minimum 4 groupes seront nécessaires pour la bonne conduite de chaque étude préclinique (3-5 doses du candidat médicament, contrôle négatif, contrôle positif...)). Les études précliniques des candidats-médicaments nécessitent l'utilisation de 8 à 10 individus par group testé. Ce nombre nous permet de d'avoir des résultats statistiquement interprétables et éviter de refaire les études et ainsi limiter le nombre d'animaux totale utilisés.

#### RAFFINEMENT:

Les souris seront monitorées quotidiennement et pesée hebdomadairement pour s'assurer de leur état général. Une perte de plus de 25% de leur point initial (avant induction de la colite par le DSS) sera considérée comme une raison d'euthanasie. De même, si un animal présente des signes de prostration, de difficultés locomoteurs ou des difficultés à s'alimenter, il sera mis à mort immédiatement.

Les animaux seront hébergés dans une animalerie de classe A2 par 5 à 6 animaux par cage ventilée. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatations dans leurs cages d'une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont hébergé avec à un cycle lumière-obscurité de 12h / 12h (07 :19h). Les animaux sont acclimatés à la présence de l'expérimentateur qui les pèse et les examine tous les jours. L'eau de breuvage (stérile) ainsi que la nourriture (stérile) sont fourni *ad libitum*. Pour réduire et éviter le stress et assurer le bien-être des animaux, chaque cage est enrichie avec des objets (cabane en carton) et la litière de chaque cage est changée régulièrement.

6102. Le développement de thérapies pour des maladies qui affectent spécifiquement le système immunitaire humain (par exemple le VIH) est fortement ralenti par le manque de modèles animaux prédictifs. Depuis quelques années, des études sur la génération de souris pourvues d'un système immunitaire humain (Souris humanisée) ont permis des avancées considérables dans ce domaine.

Les souris humanisées constituent des modèles permettant d'étudier des pathologies d'origine humaine, mais aussi de tester des médicaments destinés aux humains.

La particularité du virus du VIH qui est responsable du SIDA est sa spécificité pour certaines cellules humaines du système immunitaire. La seule alternative pour tester un candidat médicament visant à éradiquer le SIDA est l'expérimentation sur des primates. Outre les problèmes éthiques de l'expérimentation sur les singes, ce modèle n'est que trop peu prédictif pour évaluer l'efficacité un traitement. En effet, le singe ne peut être infecté que par le SIV. Le SIV est un cousin du VIH mais qui ne répond de manière équivalente au VIH en réponse à une thérapie. La souris humanisée constitue une alternative éthique et scientifiquement valide pour la mise au point de traitements innovants visant à la recherche contre le VIH. Cette mise au point est vitale car Il n'existe à ce jour, aucun traitement curatif ou vaccin contre le SIDA.

Dans le cadre de ce projet, le modèle de souris humanisée sera utilisé afin de tester des candidats médicaments ou des candidats vaccins développés par les unités de recherches académiques et par les laboratoires pharmaceutiques.

#### REMPLACEMENT:

Le virus HIV responsable du SIDA ne peut infecter que les cellules immunitaires CD4 humaines.

Il n'est actuellement pas possible, *in vitro*, de recréer un environnement qui mimerait les différents composants du système immunitaire et son interaction avec le virus. La souris humanisée constitue donc un modèle scientifiquement valide et robuste, indispensable pour le développement et la mise au point de traitements innovants visant à éradiquer le SIDA.

#### REDUCTION:

Chaque étude préclinique visant à tester l'efficacité d'un candidat médicament dirigé contre le HIV nécessite entre 50 et 100 animaux (Au minimum 4 groupes seront nécessaires pour la bonne conduite de chaque étude préclinique (3-5 doses du candidat médicament, contrôle négatif, contrôle positif...)). Les études précliniques des candidats-médicaments nécessitent l'utilisation de 8 à 10 individus par group testé.

Un total de 1000 souris adultes humanisée est demandé pour la réalisation de ce projet portant sur 5 années.

Ce nombre nous permet de d'avoir des résultats statistiquement interprétables et éviter de refaire les études et ainsi limiter le nombre d'animaux totale utilisés

#### RAFFINEMENT:

Les animaux seront hébergés dans une animalerie de classe A2 (SPF). 5 à 6 animaux par cage ventilée. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatations dans leurs cages d'une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont hébergé avec à un cycle lumière-obscurité de 12h / 12h (07 :19h). Les animaux sont acclimatés à la présence de l'expérimentateur qui les pèse et les examine tous les jours. L'eau de breuvage (stérile) ainsi que la nourriture (stérile) sont fourni *ad libitum*. Pour réduire et éviter

le stress et assurer le bien-être des animaux, chaque cage est enrichie avec des objets (cabane en carton) et la litière de chaque cage est changée régulièrement.

6103. Les matériaux polymères biocompatibles sont connus depuis plusieurs dizaines d'années en ingénierie tissulaire et en particulier pour leur usage en tant qu'implants orthopédiques. Pourtant, malgré leurs propriétés mécaniques comparables à celles de l'os cortical humain, certains polymères restent bioinertes. Pour résoudre ce problème, plusieurs études se sont concentrées sur le développement de composites à base polymère, en ajoutant des particules bioactives dans la matrice polymère.

Les futurs dispositifs seront constitués d'une matrice polymère de poly-ether-ether-cétone (PEEK), chargée en particules d'alliages métalliques complexes (CMA). Il est absolument essentiel pour la suite du projet de s'assurer de la biocompatibilité de ce matériau composite.

Un travail préliminaire a présenté des résultats encourageants et a d'ores et déjà permis de montrer une bonne biocompatibilité vis-à-vis des cellules. Mais il est crucial pour valider cette biocompatibilité et l'utilisation de ce matériau pour futur dispositif de procéder également à une étude sur un modèle animal, en chronique.

Pour cela, nous proposons une étude prospective et comparative sur 6 cochons, répartis en 2 groupes :

Groupe 1 (G1) : implantation dans l'os du tibia durant 1 mois.

Groupe 2 (G2) : implantation dans l'os du tibia durant 3 mois.

Chaque cochon recevra 12 échantillons différents (cylindres de 4 mm de diamètre et 8 mm de hauteur) :

Echantillon A (x3) : cylindre de PEEK seul

Echantillon B (x3) : cylindre de PEEK + 15 % de particules de CMA

Echantillon C (x3) : cylindre de PEEK + 30 % de particules de CMA

Afin de vérifier l'innocuité du matériau, l'état général (comprenant les observances cliniques, des mesures pondérales et les paramètres biologiques) de chaque porc sera suivi et une étude histologique sera menée.

#### 1- Remplacement

Un travail préliminaire sur la biocompatibilité/toxicité vis-à-vis des cellules a été réalisé et est très prometteur. Ces tests *in vitro* ne représentent qu'une première estimation dans l'évaluation de la biocompatibilité du matériau. Ils ont l'avantage d'être des méthodes rapides et sensibles de criblage, mais malheureusement, ils fixent implicitement des limites aux prédictions que l'on serait tenté de faire sur le comportement *in vivo* des matériaux ou des dispositifs considérés. Le problème de la transposition des résultats obtenus *in vitro* à l'application en clinique humaine reste entier et les renseignements ultimes ne pourront être fournis que par l'étude des interactions hôte/biomatériau *in vivo* chez un modèle animal comme le cochon.

#### 2- Réduction

Nous proposons un travail expérimental prospectif et comparatif pour lequel le nombre d'animaux utilisé (6 cochons) est optimisé de façon maximale :

- chaque animal sera son propre contrôle

- chaque animal recevra 12 échantillons différents.

Ainsi, le nombre d'animaux éligibles est considérablement diminué.

#### 3-Raffinement

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu) et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires si nécessaire) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent.

Des mesures très complètes de suivis cliniques et paracliniques seront menées selon les protocoles standards mis en place dans notre structure comprenant des points limites afin d'éviter toute souffrance de l'animal : variation du poids de l'animal, apparence physique externe, changement dans les comportements non provoqués et réponses comportementales aux *stimuli* externes.

6104. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des motoneurons, par une atrophie musculaire et une paralysie progressive. Considérée comme la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte, la SLA frappe environ 8000 patients en France. Les premiers symptômes apparaissent généralement vers 55 ans. La SLA est une maladie mortelle et incurable. La maladie affecte les tissus impliqués dans le contrôle de la fonction motrice, à savoir la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces trois acteurs est donc la clé de la recherche sur cette pathologie. De plus, environ 40-50% des patients SLA développent des atteintes cognitives compatibles avec des démences de types fronto-temporales.

Le métabolisme des lipides influence la sévérité et la progression de la SLA. Il a été démontré que le métabolisme des sphingolipides (classe de lipides complexes) est fortement perturbé chez les patient SLA ainsi que dans des modèles murins de SLA et de dénervation musculaire. Notre hypothèse est que le glucosylcéramide, un sphingolipide, participe au maintien et la régénérescence des unités motrices. Nous proposons de réduire la dégradation du glucosylcéramide, en inhibant l'activité de bêta-glucosidase, par une approche pharmacologique dans le modèle murin CHMP2B de la SLA qui récapitule un phénotype cognitif (diminution de l'anxiété et des interactions sociales) et moteur (faiblesse musculaire, troubles locomoteurs puis parésie) de la maladie.

De plus, nous envisageons de coupler cette stratégie pharmacologique à une approche nutritionnelle, dans le but d'ajouter leurs effets neuroprotecteurs, dans le modèle murin SOD1, qui récapitule les symptômes moteurs (faiblesse musculaire, troubles locomoteurs puis parésie) de la SLA.

La sclérose latérale amyotrophique est une maladie d'origine plurifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser de façon satisfaisante la complexité des unités motrices. Nous avons donc besoin de recourir à un modèle animal

pour ce projet de recherche. Cependant, le choix des molécules a été orienté grâce à des études de pharmacologie *in vitro*, qui ont remplacés des études *in vivo*.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles. Ainsi, le nombre de souris incluses dans le projet est lié de la nature des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats. Le projet est constitué de 3 procédures et nécessitera un maximum de 200 souris (96 souris SOD1, 24 souris CHMP2B, 80 souris non-transgéniques). La mise en œuvre d'une des procédures sera conditionnée à l'obtention de résultats significatifs aux procédures précédentes. Les souris SOD1 modélisent la sclérose latérale amyotrophique et les souris CHMP2B présentent des phénotypes similaires à des atteintes fronto-temporales.

Une réduction du nombre d'animaux risquerait d'invalider la significativité des résultats et donc de l'ensemble du projet. L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de détecter rapidement et de limiter la souffrance des animaux, et de s'assurer de leurs bien-être.

De plus, les traitements envisagés se feront par l'alimentation afin de supprimer le stress lié aux injections intrapéritonéales. Nous avons également favorisé au maximum des tests non-invasifs pour étudier les fonctions motrices des animaux.

6105. L'utilisation d'antibiotiques est la seule mesure qui s'avère efficace contre les infections chroniques bactériennes pulmonaires. Néanmoins, des posologies mal adaptées d'antibiotiques (ATB) sont à l'origine de concentrations trop faibles dans les fluides pulmonaires, ce qui entraîne une sélection de bactéries résistantes. Dans un contexte de pénurie de nouveaux ATB, il convient de développer de nouvelles stratégies d'administration des ATB existants. L'administration pulmonaire d'antibiotiques sous forme d'aérosol permet de cibler directement les poumons et d'augmenter l'effet thérapeutique tout en réduisant les effets secondaires systémiques. L'action directe au niveau des tissus cibles permet l'administration de plus faibles doses d'antibiotique tout en obtenant des concentrations locales élevées. Dans ce but, des microparticules chargées en antibiotiques, capables d'atteindre les alvéoles pulmonaires quand elles sont administrées au moyen d'un inhalateur de poudre et permettant d'obtenir une libération prolongée des molécules au sein du poumon, ont été développées. Elles permettraient si administrées au patient de diminuer la fréquence des inhalations, d'augmenter l'adhésion au traitement et son confort. Les fluoroquinolones (FQs) sont des antibiotiques utilisés par voie orale pour le traitement des infections pulmonaires chroniques à *Pseudomonas aeruginosa*, mais sont maintenant envisagés pour être développés sous forme d'inhalateur de poudre. Entre 2012 – 2015, des études cliniques de phase 2 et 3 ont montrées des données prometteuses après inhalation de poudre de FQ. Cependant, le passage au niveau systémique des FQs après inhalation pulmonaire est très rapide, ce qui ne permet pas d'obtenir de fortes concentrations pulmonaires. Toutefois, il est connu que les FQs administrées par voie orale interagissent avec les cations métalliques (éléments chimiques chargés positivement), ce qui diminue leur absorption. De précédents travaux ont permis d'utiliser cette propriété et de développer des microparticules composées de ciprofloxacine (CIP, une FQ) et d'un cation métallique, le cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Ces microparticules présentent des propriétés aérodynamiques leur permettant d'atteindre les alvéoles pulmonaires et il a été démontré que la présence de cuivre permet de maintenir des concentrations élevées de ciprofloxacine dans le poumon après administration de ces microparticules.

Le but de ce projet est donc de comparer, chez le rat présentant une infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*, l'efficacité de cette formulation de microparticules sous forme de poudre sèche contenant de la ciprofloxacine couplée à du cuivre à celle d'une solution de ciprofloxacine administrée par nébulisée ou par voie intraveineuse. L'efficacité du traitement est évaluée par une technique d'imagerie par bioluminescence. Les bactéries utilisées pour induire l'infection pulmonaire sont capables d'émettre un signal lumineux permettant d'obtenir des images (totalement indolores pour l'animal) et donc de quantifier le niveau de l'infection chez un même animal vivant et anesthésié. Ce projet sera réalisé chez le rat du fait des contraintes liées à la pesée de la poudre sèche pour la nébulisation, les masses à peser pour atteindre les doses de ciprofloxacine voulues étant trop faibles pour les balances disponibles pour envisager un modèle souris.

Le projet sera réalisé en deux parties :

- La première partie consistera à mettre au point et à valider le modèle d'infection chronique chez le rat. L'infection sera induite par la nébulisation de bactéries intégrées dans des perles d'agar. La quantité de bactéries et de billes d'agar à inoculer par voie intratrachéale afin d'obtenir une infection chronique et un signal de bioluminescence suffisant pour permettre le suivi de l'infection après traitement devra être déterminé. Trois *inocula* seront utilisés avec deux conditions d'inoculation : soit une inoculation unique soit des inoculations répétées. L'inoculation des bactéries sera réalisée sur l'animal anesthésié.

- La deuxième partie sera une étude destinée à évaluer l'efficacité d'un traitement par inhalation d'une formulation de poudre sèche contenant de la ciprofloxacine chez le rat infecté. Cette efficacité sera comparée à celle d'un traitement par une solution de ciprofloxacine administrée par voie nébulisée ou par voie intra-veineuse (IV). Cette deuxième étape implique donc chez un même animal de suivre l'efficacité du traitement administré (par voie nébulisée ou par voie IV) par un suivi de l'infection après traitement à l'aide d'une technique de bioluminescence (étude pharmacodynamique, PD) et parallèlement de mesurer les concentrations plasmatiques et pulmonaires de ciprofloxacine (étude pharmacocinétique, PK). Les prélèvements pour l'étude PK seront réalisés pendant 6h, correspondant au temps de présence de la ciprofloxacine chez un rat non infecté observé dans une étude préalable. L'étude d'efficacité sera quant à elle réalisée sur 24h afin d'observer ultérieurement les éventuels phénomènes de résistances.

Nous avons pris en considération dans cette étude la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Il n'existe pas de modèle alternatif qui mime les concentrations plasmatiques et pulmonaires, observées chez un être vivant, à la suite d'une administration de substance médicamenteuse. En effet les études d'efficacité de formulations solides ne sont pas réalisables *in vitro* car ces techniques nécessitent l'utilisation de molécules en solution. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et limiter la variabilité, un même animal sera utilisé pour la mesure de 2 paramètres (PK et PD) indispensables à l'analyse des résultats avec un suivi de l'infection au cours du temps par technique d'imagerie bioluminescente. Toutes les interventions sur les animaux (inoculation de bactéries, administration du traitement, prélèvements...) seront réalisées sous anesthésie afin de limiter le stress et la douleur de l'animal et cela nous permettra également de réaliser les images sans avoir à exercer une contention sur les animaux.

186 rats ont été comptabilisés pour ce projet.

Cette recherche est innovante et apporterait une véritable information sur la mesure de l'efficacité d'un traitement aérosol innovant de ciprofloxacine sous forme de poudre sèche versus un traitement IV de ciprofloxacine, information qui n'est actuellement pas disponible dans la littérature.

6106. La consommation de viande est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques ont été consolidées par des études en laboratoire à l'aide de modèles animaux et cellulaires. Ces études animales ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : des travaux précédents ont permis de démontrer que le fer sous forme hémique était responsable de cet effet en catalysant un fort stress oxydant dans la lumière intestinale. L'utilisation de cellules en culture a permis de montrer que les produits d'oxydation des graisses que l'on trouve au niveau de la lumière du tube digestif lors de ce stress oxydant étaient plus toxiques pour les cellules saines que pour les cellules portant déjà une mutation, favorisant ainsi la prolifération des cellules mutées et de fait, l'apparition du cancer. Le facteur de transcription Nrf2 joue un rôle majeur dans la réponse cellulaire au stress oxydant et est une plaque tournante des mécanismes de défense cellulaires. Cependant son rôle dans la cancérogenèse est ambigu : certains travaux laissent penser que pour les stades précoces du cancer, l'activation de Nrf2 serait protectrice alors que pour les stades plus avancés, son activation serait promotrice du cancer. Une équipe américaine vient de créer une souche de rats, pour laquelle le gène Nrf2 a été invalidé. Ce nouveau modèle permettra de déterminer *in vivo* les effets de la délétion de la protéine NRF2, en particulier sur les conséquences d'une alimentation riche en produit pro-oxydants inductrice du cancer colorectal et sur les effets de molécules alimentaires protectrices visant à prévenir ce cancer. Le but de ce projet est d'évaluer *in vivo*, dans un contexte d'absence ou non de la protéine Nrf2, les conséquences d'un apport alimentaire en un aldéhyde modèle de la peroxydation lipidique.

L'utilisation de cellules en culture a permis de préciser les mécanismes moléculaires, cependant, les études *in vitro* ne permettent pas d'évaluer l'ensemble des répercussions induites par des régimes complexes au niveau de l'épithélium colique, nécessitant de fait, l'utilisation indispensable de modèles animaux. Néanmoins, l'expérimentation *in vitro* et l'utilisation de tests statistiques adaptés permettent de réduire le nombre d'hypothèses et ainsi le nombre d'animaux. Ainsi, le nombre de rats est réduit au maximum sans toutefois impacter la qualité statistique de nos résultats ; le raffinement est inclus avant (protocoles limitant les interventions sur les animaux), pendant (durée réduite au maximum en travaillant sur des stades précoces du cancer) et après (exploitation optimale des données).

Dans cette étude pilote, nous utiliserons au total 18 rats femelles, invalidés pour le gène Nrf2 (hétérozygotes Nrf2<sup>+/-</sup> et homozygotes Nrf2<sup>-/-</sup>) et leurs contrôles sauvages, répartis en 3 groupes de 6 animaux. Les animaux seront soumis à un régime alimentaire standard, la molécule test sera apportée par gavage quotidien pour la moitié des animaux par groupe (n=3). Cette expérimentation a pour but d'identifier les différences, liée au génotype, des effets d'un aldéhyde modèle au niveau intestinal et colique.

6107. Dans le système nerveux, l'information se propage le long du neurone par des petits courants électriques dit potentiels d'action pour se transmettre aux autres neurones avec lequel il est connecté. Cette communication se fait au niveau de la synapse où le signal électrique est converti en signal chimique. Cette synapse est donc faite de 3 éléments : la terminaison du neurone présynaptique, la fente synaptique et la terminaison du neurone postsynaptique. Quand le signal électrique arrive au niveau de la présynapse, un neurotransmetteur est libéré dans la fente synaptique et comme une clé dans une serrure, va activer des récepteurs spécifiques insérés dans la membrane du neurone postsynaptique. Ces récepteurs codent le signal obtenu en sortie en un signal électrique capable de se propager à son tour. La connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones et de leur « utilisation » de cette connexion et ceci grâce à la plasticité synaptique qui est la propriété que les synapses ont de changer en force en fonction de l'usage qui en est fait. Elle permet d'expliquer de nombreuses formes de mémoire simple présentes chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé.

La neurotransmission peut donc être excitatrice, inhibitrice ou modulatrice. La transmission excitatrice se fait principalement grâce au glutamate, un acide aminé. Les récepteurs spécifiques qui lui sont associés sont regroupés en 3 familles (AMPA, NMDA, et kaïnate). Les AMPA et les NMDA permettent le phénomène de potentialisation à long terme (ou LTP en anglais) qui est un renforcement persistant des synapses en produisant une augmentation de longue durée dans la transmission du signal entre deux neurones. Notre groupe travaille sur ce phénomène complexe de LTP encore mal connu et à déjà montré l'importance des mouvements des récepteurs AMPA dans la membrane au voisinage de la synapse. Notre synapse modèle est celle de la région de l'hippocampe de rongeur, connue pour son implication dans les phénomènes de mémoire et d'apprentissage. En effet en utilisant *in vitro* des cultures de neurones de la région de l'hippocampe du cerveau de souris et des tranches d'hippocampe en culture, en immobilisant ces récepteurs AMPA avec des molécules spécifiques, nous avons pu modifier la LTP mesurée entre des neurones, montrant le rôle majeur de la mobilité de ces récepteurs dans cette plasticité synaptique. Ce projet a pour but de reproduire *in vivo* cette approche d'immobilisation des récepteurs AMPA chez l'animal pour en mesurer l'impact sur sa mémoire. Ainsi, notre stratégie expérimentale sera la suivante 1) injection de molécules capables d'immobiliser les récepteurs AMPA dans la région de l'hippocampe de souris adultes et des enregistrements électrophysiologies seront faits pour mesurer des courants postsynaptiques sur animal anesthésié 2) les temps d'action de ces molécules étant courts, les hippocampes des souris seront implantés avec des canules afin de pouvoir injecter ces molécules, avant de soumettre les animaux à un test de mémoire de conditionnement par la peur. Nous espérons ainsi pouvoir mesurer des déficits de mémoire chez les animaux dont les récepteurs AMPA auront été immobilisés. Des groupes témoins recevront les solutions véhicules de ces molécules. L'utilisation d'approche comportementale nécessite donc l'utilisation d'animaux. Ce projet utilisera 103 souris C57BL6/J. Mais dans le respect du R de réduire de la règle des 3R, nos groupes expérimentaux seront dimensionnés pour utiliser le plus petit nombre possible d'animaux pour avoir néanmoins des statistiques solides. Dans le souci du R de raffiner, nous soulagerons les douleurs générées durant les chirurgies par des molécules antalgiques

les plus adaptées. Nous réduirons le plus possible le stress lié aux tests comportementaux par des phases d'habituation des animaux par l'expérimentateur. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de sa vie.

6108. Ce projet porte sur le maintien et la production d'une lignée transgénique, surnommée « tet-tag ». L'utilisation de cette lignée bi-transgénique permet le marquage permanent de certaines populations de neurones activées pendant une période restreinte. Ce marquage implique la transcription d'un transgène sous le contrôle d'un promoteur « tetracycline responsive » (« tet-O » ou « TRE »). L'activation de ce type de promoteur se fait sous le contrôle de l'antibiotique tetracycline (ou ses analogues comme la doxycycline). Pour éviter l'expression constitutive de ces transgènes, les souris « tet-tag » seront nourries avec une alimentation spécifique qui contient de la doxycycline. En accord avec le principe des 3Rs (remplacement, réduction, raffinement), nous avons réfléchi à notre projet de production de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisé ainsi que la souffrance imposée par nos manipulations. Remplacement : Les modèles de remplacement *in vitro* actuellement disponibles ne reproduisent pas l'architecture du cerveau et ne permettent pas la modélisation des processus cognitifs – un aspect crucial de nos éventuels projets de recherche. D'autre part, la souris est à ce jour le seul modèle mammifère, dont le génome est facilement modifiable, permettant l'expression des molécules nécessaires pour nos projets de recherche. Réduction : afin de ne pas produire plus que le nombre minimal d'animaux nécessaires pour nos éventuels projets de recherche, nous avons déterminé statistiquement le nombre minimal d'animaux requis pour chaque type d'expérience (saisine complémentaire). Raffinement : les animaux seront hébergés de manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Le bénéfice attendu de ce projet est une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires sous-jacents des processus cognitifs et, à terme, l'identification des nouvelles stratégies thérapeutiques pour soigner les troubles cognitifs. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire pour ce projet de production à 600 animaux.

6109. Ces études nécessitent le développement d'un ou plusieurs anticorps spécifiques qui permettent la détection de ce facteur directement dans les biopsies tumorales (par la technique d'immunohistochimie). A ce jour, il n'existe pas de tels anticorps, ni dans le commerce, ni dans le milieu de la recherche, d'où la nécessité de produire des anticorps spécifiques dirigé contre un antigène dérivé de ce facteur. A la différence de l'ADN et des protéines, à ce jour il n'existe pas une technologie qui permette de produire un anticorps synthétique à partir d'un antigène donné. D'où la nécessité de produire les anticorps chez des animaux, dans ce cas spécifique chez les lapins. Cette méthode est d'utilisation courante pour le développement d'anticorps chez les lapins dans la plupart des laboratoires de recherche en France et dans le monde. Le recours au lapin est peu coûteux, nécessite peu d'investissement humain et permet d'obtenir rapidement une bonne quantité de sérum qui sera largement suffisante pour toutes les études décrites au paragraphe précédent. Deux lapins maximum par protocole d'immunisation seront utilisés. Ceci est nécessaire afin de compenser d'une part la perte éventuelle d'animaux qui n'auront pas supporté le protocole d'immunisation, et d'autre part les réponses individuelles trop hétérogènes qui conduiront à l'écart des animaux du protocole. Pour ce protocole d'immunisation, nous utiliserons 4 lapins, qui seront injectés avec deux antigènes différents. L'utilisation de deux antigènes distincts est pratique commune dans la production d'anticorps, car elle permet d'augmenter la probabilité d'obtenir l'anticorps souhaité. L'utilisation de deux lapins constitue la quantité minimale d'animaux pour le développement d'un tel protocole. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse éventuelle suite à l'expérimentation en objet, les animaux seront traités avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) par administration orale pendant 5 jours.

6110. La Maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par des pertes de mémoire et de fonctions physiologiques associées à l'accumulation de protéines dans le cerveau. Les protéines Tau s'accumulent à l'intérieur des neurones et les tuent, alors que les protéines A $\beta$  s'accumulent à l'extérieur et modifient le fonctionnement des neurones. Des formes agrégées d'A $\beta$  sont actuellement considérées comme un agent pathogène précoce dans la maladie d'Alzheimer. En conséquence, ce sont des cibles de choix pour traiter cette maladie. L'agrégation du peptide A $\beta$  commence lorsque (1) l'expression de l'APP et la production d'A $\beta$  augmente de façon non contrôlée ou (2) l'élimination de l'A $\beta$  produit est dérégulée et devient insuffisante.

Le Bexarotene permet d'activer les systèmes d'élimination du peptide  $\beta$  amyloïde en augmentant l'expression de transporteurs de l'A $\beta$  et donc de diminuer la quantité d'A $\beta$  présents dans le cerveau. Cette molécule a été autorisée aux Etats-Unis pour le traitement d'un cancer et les études actuelles ont révélées l'absence d'effet délétère chez l'homme. Des études récentes ont suggéré que cette molécule administrée par voie orale est capable de réduire la charge amyloïde dans le cerveau des animaux transgéniques et d'améliorer les déficits cognitifs. D'autres études contredisent ces résultats. Nous souhaitons clarifier ce débat en étudiant l'impact de ce traitement dans des modèles transgéniques de MA. Nous étudions sur une même population de souris les effets du Bexarotene à la fois sur les déficits cognitifs mais aussi sur les formes du peptide A $\beta$  vasculaires et neuronales et les transporteurs d'A $\beta$ .

Ce projet a déjà concerné 5 lots de 12 souris couverts par une saisine précédente. Afin de terminer cette étude nous souhaitons utiliser 50 souris supplémentaires. Nous ne pouvons pas Remplacer tout ou partie de ces études par des tests *in vitro* ou sur cellule car nos expériences requièrent l'étude du comportement et des capacités mnésiques de l'animal. Dans notre étude, les expériences sont menées sur mâles et femelles en parallèle afin de comparer les effets sur les 2 sexes et les souris simples transgéniques produites lors des croisements ont été utilisées par différents groupes de recherche locaux afin de Réduire les productions parallèles et les euthanasies d'animaux. Nos expériences ont été conçues et Raffinées en optimisant les informations obtenues sur chaque souris. Des points limites et critères d'interruption sont observés tout au long de nos procédures afin de veiller au bien-être des animaux et à l'interprétation de nos résultats. Cette approche permet de Réduire le nombre d'animaux utilisés et d'obtenir des informations coordonnées et les plus complètes possibles sur chaque souris.

Ces souris ont été produites en 2015, elles doivent être testées en comportement en 2016 avant décès spontanés des animaux transgéniques.

6111. Avec une croissance moyenne annuelle de 8.9% depuis les années 1970, l'aquaculture représente aujourd'hui le secteur de production pour l'alimentation humaine ayant la plus forte croissance au niveau mondial. L'Asie produisant 91.2% du volume et 82% de la valeur de la production aquacole mondiale. Parallèlement à cette forte croissance, des problématiques liées à l'alimentation des poissons d'élevage sont apparues. Une des plus importantes est l'utilisation de très grandes quantités de farines de poissons (d'origine sauvage) comme ingrédient indispensable des aliments pour poissons d'élevage carnivores. En effet, avec la croissance de l'aquaculture, le prix de ces farines augmente de façon continue. Ce marché générerait à long terme des niveaux de prélèvements sur les ressources marines incompatibles avec des gestions raisonnées et durables. De plus, la qualité de ces farines est difficile à maîtriser car elle peut fluctuer de façon importante. C'est dans ce contexte de volonté de diminution de l'utilisation des farines de poissons dans l'alimentation piscicole, que d'autres sources de nutriments ont été testées, notamment celles d'origine végétale. De nombreux essais ont mis en évidence que certains de ces composés d'origine végétale pouvaient induire des problèmes digestifs chez les poissons en lien avec leur moins bonne digestibilité et certains facteurs antinutritionnels qu'ils peuvent renfermer. Le projet s'inscrit dans la recherche d'additifs alimentaires permettant d'améliorer la physiologie digestive chez certains poissons et ainsi réduire les effets négatifs des ingrédients de substitution des farines de poissons. Il vise précisément à déterminer si un additif alimentaire prédéfini peut avoir une efficacité sur l'amélioration de la physiologie digestive et le cas échéant quel serait le taux d'incorporation à recommander. Les essais seront menés sur une espèce importante en aquaculture marine, le bar commun ou bar européen (nom latin : *Dicentrarchus labrax*) et mettront en œuvre des aliments volontairement carencés. Les potentiels effets de cet actif sur la physiologie digestive du bar seront mis en évidence via différentes mesures. Ainsi, la vitesse de croissance sera calculée de même que l'indice de conversion alimentaire qui correspond à la capacité des poissons à bien utiliser l'aliment pour grossir. De façon fine, des observations seront effectuées au microscope pour voir ce qui se passe au niveau du tube digestif. D'autres analyses permettront de savoir précisément quels composants de l'aliment le poisson est capable d'utiliser pour croître ou à l'inverse ceux qu'il ne digère pas et rejette dans ses excréments. Encore plus finement des recherches seront menées sur des dérivés de l'ADN pour comprendre précisément comment les cellules de l'intestin répondent aux différents régimes alimentaires testés. En effet ces cellules synthétisent alors, en plus ou moins grande quantité, certaines molécules révélatrices de l'état de santé de l'intestin. Si les effets de l'actif sont avérés, cela ouvrira pour les aquaculteurs des perspectives de réduction des coûts liés à l'alimentation, tout en leur permettant de conserver des performances de croissance optimales sur leurs poissons. Cela ira également dans le sens d'une réduction de l'impact négatif sur l'environnement d'une pêche trop importante de poissons sauvages destinés à la farine. Dans le cas contraire, les formulations testées pourront être écartées de ce type de tests. Pour répondre à la règle des 3R, nous nous sommes interrogés sur la possibilité de REMPLACER cette expérimentation, mais il n'existe pas à aujourd'hui de méthodes substitutives permettant d'accéder aux types de données recherchées. Le choix de réaliser cette expérimentation sur l'espèce *Dicentrarchus labrax* est lié à son importance économique. En effet, il s'agit de la première espèce d'élevage marin en France et de la deuxième en Europe derrière le saumon. En raison de ses caractéristiques morphologiques, comportementales, et surtout physiologiques, il ne serait pas pertinent de remplacer cette espèce par une autre pour ce genre de test.

Pour REDUIRE le nombre d'animaux utilisés, les effectifs à mettre en œuvre ont été précautionneusement déterminés dans le but de les minimiser tout en conservant une puissance statistique élevée (adaptée à la variabilité des facteurs étudiés) permettant d'obtenir des résultats fiables ne nécessitant pas de nouvelles expérimentations. Une orientation importante est de placer les animaux dans des conditions qui se rapprochent de celles de l'élevage (puisque c'est dans cette optique que les conclusions devront s'appliquer) tout en minimisant au maximum les densités. En deçà de cette limite de densité minimale, le comportement alimentaire des bars risquerait fortement de devenir « anormal » avec des compétitions potentiellement renforcées entre les différents individus et des disparités de croissance plus importantes. En effet, il est reconnu que la densification, pour cette espèce, annihile ou amoindrit certains comportements antagonistes. Le nombre d'animaux retenu pour être mis en expérimentation est de 320 individus par bac, correspondant à une densité de 8 kg de poisson/m<sup>3</sup> d'eau, soit pour l'ensemble des bassins testés, au nombre de 20, un total de 6400 poissons.

Enfin, pour RAFFINER le protocole, nous avons cherché à minimiser les facteurs liés au stress dès le transport et dans les nouvelles conditions d'élevage. Les animaux seront notamment acclimatés dans les bassins expérimentaux pendant une semaine avant le début du test. Les différents échantillonnages nécessaires à la réalisation de l'expérience ont été rigoureusement planifiés afin de réduire et d'éviter toute manipulation superflue pouvant générer du stress. L'étude de la digestibilité des aliments est basée sur une méthode non invasive de collecte des fèces sans manipulation des poissons. Les autres échantillonnages (animaux entiers ou prélèvement d'une partie du tube digestif) se feront sur des animaux préalablement euthanasiés par surdose d'anesthésiant. Ainsi, les procédures mises en œuvre au cours de l'essai sont établies pour ne pas induire de dépassement de point limite.

6112. Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité par épreuve de candidats médicaments destinés aux espèces aviaires.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un bilan risques/bénéfices favorable pour une ou plusieurs pathologies. Les études nécessaires comprennent, entre autres, des études menées sur les animaux.

Ces études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici les volailles) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s), ce qui permet de s'approcher, au maximum, des conditions réelles d'utilisation. Ces études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations nationales et internationales concernant les vaccins.

Pour démontrer l'efficacité d'un médicament contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire de manière expérimentale et le plus fidèlement possible, les conditions réelles de développement de la pathologie.

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

Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicaments d'un niveau d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et garantir les performances zootechniques et économiques.

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

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement (R&D) à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 9600 poules (comprenant les poules pondeuses et les poulets), et à 650 dindes.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un vaccin consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Un recueil d'informations est également apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

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

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

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

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

6113. Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité par épreuve de candidats médicaments destinés aux espèces aviaires.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un bilan risques/bénéfices favorable pour une ou plusieurs pathologies. Les études nécessaires comprennent, entre autres, des études menées sur les animaux.

Ces études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici les volailles) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s), ce qui permet de s'approcher, au maximum, des conditions réelles d'utilisation. Ces études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations nationales et internationales concernant les vaccins.

Pour démontrer l'efficacité d'un médicament contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire de manière expérimentale et le plus fidèlement possible, les conditions réelles de développement de la pathologie.

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

Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicaments d'un niveau d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et garantir les performances zootechniques et économiques.

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

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement (R&D) à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 5300 poules (comprenant les poules pondeuses et les poulets), et à 700 dindes.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un vaccin consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Un recueil d'informations est également apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

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

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

Raffinement :

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

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

6114. Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité par épreuve de candidats médicaments destinés aux espèces porcine et caprine.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un bilan risques/bénéfices favorable pour une ou plusieurs pathologies. Les études nécessaires comprennent, entre autres, des études menées sur les animaux.

Ces études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici les porcs et les caprins) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s), ce qui permet de s'approcher, au maximum, des conditions réelles d'utilisation. Ces études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations nationales et internationales concernant les vaccins.

Pour démontrer l'efficacité d'un médicament contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire de manière expérimentale et le plus fidèlement possible, les conditions réelles de développement de la pathologie.

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

Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicaments d'un niveau d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et garantir les performances zootechniques et économiques.

L'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques sévères provoquant une douleur chez l'animal. C'est pourquoi, des points limites spécifiques aux pathologies sont appliqués et des antalgiques sont utilisés.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des substances testées, les exigences réglementaires et sur les projets Recherche et Développement (R&D) existants et à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 350 porcs, et 300 caprins.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un vaccin consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Un recueil d'informations est également apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Le recours à l'espèce cible est, à l'heure actuelle, indispensable, afin d'observer le plus fidèlement possible, les effets sur les espèces qui pourront bénéficier de ces traitements.

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

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

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

6115. Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité par épreuve de candidats médicaments destinés aux espèces bovine et ovine.

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un bilan risques/bénéfices favorable pour une ou plusieurs pathologies. Les études nécessaires comprennent, entre autres, des études menées sur les animaux.

Ces études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici les bovins et les ovins) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s), ce qui permet de s'approcher, au maximum, des conditions réelles d'utilisation. Ces études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations nationales et internationales concernant les vaccins.

Pour démontrer l'efficacité d'un vaccin contre un agent pathogène, la mise au point d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire de manière expérimentale et le plus fidèlement possible, les conditions réelles de développement de la pathologie.

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



Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicament d'un niveau d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et garantir les performances zootechniques et économiques.

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques. C'est pourquoi des points limites spécifiques aux pathologies sont appliqués.

De plus, l'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des substances testées, les exigences réglementaires et sur les projets Recherche et Développement (R&D) existants et à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 970 bovins, et 500 ovins.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Un recueil d'informations est également apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

Le recours à l'espèce cible est, à l'heure actuelle, indispensable, afin d'observer le plus fidèlement possible, les effets sur les espèces qui pourront bénéficier de ces traitements.

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

Raffinement :

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

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

6116. 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 (remplacer, réduire et raffiner) est ainsi mise en œuvre dans toutes les études. L'objectif de ce projet est la réalisation des études de toxicologie chez le rongeur 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. Dans les études précliniques une étude de rongeur et une étude non rongeur sont nécessaires. 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 78500 animaux. Le nombre important d'animaux utilisé s'explique par la grande quantité d'études différentes réalisées pour des produits différents. Le rongeur est une espèce homogène d'un point de vue des conditions d'hébergement. Nous nous engageons à socialiser au mieux les animaux lorsque la situation le permet, en effet les rats sont socialisés ainsi que les souris femelles, mais les souris mâles sont isolées pour cause de bagarres entre eux. Un programme d'enrichissement est mis en pratique, du papier kraft ou encore du bois à ronger est mis à la disposition des animaux. Les études précliniques consistent à administrer des 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 nous socialiserons les animaux lorsqu'il le sera possible. Les techniques susceptibles d'engendrer du stress 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. Ils sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet. Ils 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.

6117. La qualité des écosystèmes et leur préservation est en lien direct 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. Étant donné que ces dangers peuvent concerner l'eau, il est indispensable de les apprécier au moyen d'essais en laboratoire permettant

d'évaluer, dans les milieux aqueux, la génotoxicité d'une eau, d'un effluent, d'une substance ou d'une préparation vis-à-vis des organismes vivant en milieu aquatique. Les effets recherchés peuvent être aigus (mort) ou chroniques (croissance, développement larvaire, génotoxicité).

Ces essais rentrent dans le cadre de nombreuses réglementations (du type REACH, CLP, Biocides, phytosanitaires, OSPAR) et permettent d'évaluer les risques pour l'environnement, et plus particulièrement les milieux aquatiques. L'ISO (Organisation internationale de normalisation) a mis en place de nombreuses normes internationales afin de normaliser et d'évaluer la génotoxicité d'une substance (dans le cadre réglementaire d'autorisation de mise sur le marché d'une nouvelle substance ou d'évaluation des risques).

Ces tests sont nécessaires pour évaluer la capacité d'une substance à venir altérer l'intégrité de l'ADN, de manière non spécifique, avec des cassures, mutation.

Cette étude correspond à l'évaluation de la génotoxicité par le mesurage de l'induction de micronoyaux, sur les larves d'une espèce d'amphibiens vivant en milieu aquatique, en suivant la norme ISO 21427-1:2006 (F) ou une méthode équivalente. L'effet génotoxique sera évalué par l'apparition ou non de micronoyaux au niveau des érythrocytes présents dans le sang des larves après une exposition de 12 jours. Les micronoyaux correspondent à des cassures de l'ADN qui se produisent lors de la méiose (division cellulaire).

Dans le cadre de ces essais, avec un test préliminaire (avec trois concentrations et un témoin négatif avec 10 individus par lot) et un test définitif (cinq concentrations, un témoin négatif et un témoin positif avec 20 individus par lot), un test complet nécessite 180 larves de *Xenopus laevis* au stade 50 (les animaux sont au stade têtard, mesurent de 20 mm à 27 mm de long et présentent un étranglement à la base de la patte postérieure). Le nombre total d'animaux utilisé dans ce projet sur les 5 ans en majorant par la réalisation d'une substance par mois sera au maximum de 10800 larves.

Etant donné la complexité de ces organismes aquatiques, il n'existe pas de modèle cellulaire *in vitro* connu permettant d'évaluer les effets génotoxiques de substances vis-à-vis des organismes vivant en milieu aquatique. Des tests *in vitro* (SOS chromotest, test AMES) sont disponibles et permettent d'évaluer les effets génotoxiques sur des souches bactériennes, mais ces résultats ne sont pas extrapolables chez un organisme aquatique tel que le *Xenopus laevis*.

Cependant, afin de limiter l'utilisation de vertébrés, les essais sur xénopes seront réalisés après les essais *in vitro*.

Dans un but de réduction du nombre d'animaux utilisés, les essais seront groupés par deux (nombre maximum afin d'avoir des larves issues de la même ponte) et ainsi utiliser un seul contrôle positif et négatif (320 larves pour deux substances testées au lieu de 360). Dans un contexte de raffinement, le test préliminaire permet d'évaluer 3 concentrations et ainsi d'éviter une mortalité des larves, les concentrations d'exposition ne devant être en aucun cas létales. Les larves seront également utilisées à la fin des essais, après euthanasie, en biologie moléculaire pour la recherche de biomarqueurs (par PCR quantitative) ou en imagerie MALDI pour déterminer la localisation et les mécanismes d'actions des substances testées (mesure de la masse/charge (m/z) par spectrométrie de masse et localisation sur coupe de tissus des substances ciblées).

6118. Traiter le cancer en utilisant notre propre système de défense, le système immunitaire : ce concept est appelé l'immunothérapie. Evoqué de longue date, il est en passe de bouleverser la prise en charge des cancers. Les chercheurs explorent les nombreuses pistes possibles pour faire en sorte que le système immunitaire s'attaque de façon efficace et spécifique aux cellules cancéreuses. C'est dans ce cadre que les chercheurs ont besoin de nouveaux modèles précliniques prédictifs. En effet, les modèles traditionnels permettaient uniquement d'analyser l'effet d'un candidat médicament sur la tumeur. L'utilisation de la souris humanisée permet en plus d'étudier l'impact du candidat médicament sur le système immunitaire humain et ainsi observer comment il réagit face au cancer. Le modèle de souris humanisée sera ainsi utilisé afin de tester des candidats médicaments qui visent à stimuler notre propre système immunitaire et à diriger son action pour vaincre le cancer.

#### REMPLACEMENT:

En oncologie, les nouvelles thérapies visent à stimuler et à entraîner le système immunitaire afin de vaincre le cancer.

Il n'est actuellement pas possible, *in vitro*, de recréer un environnement qui mimerait les différents composants du système immunitaire et son interaction avec la tumeur. La souris humanisée constitue donc un modèle scientifiquement valide et robuste, indispensable pour le développement et la mise au point de traitements innovants visant à la recherche à lutter contre le cancer.

#### REDUCTION:

Chaque étude préclinique visant à tester l'efficacité d'un candidat médicament nécessite entre 50 et 100 animaux (Au minimum 4 groupes seront nécessaires pour la bonne conduite de chaque étude préclinique (3-5 doses du candidat médicament, contrôle négatif, contrôle positif...)). Les études précliniques des candidats-médicaments nécessitent l'utilisation de 8 à 10 individus par groupe testé.

Un total de 1000 souris adultes humanisées est demandé pour la réalisation de ce projet portant sur 5 années.

Ce nombre nous permet de disposer de résultats statistiquement interprétables et éviter de refaire les études et ainsi limiter le nombre d'animaux totaux utilisés.

#### RAFFINEMENT:

Les animaux seront hébergés dans une animalerie de classe A2 (SPF). 5 à 6 animaux par cage ventilée. Les animaux bénéficient d'une période d'acclimatation dans leurs cages d'une semaine avant le début de l'expérimentation. Les animaux sont hébergés avec un cycle lumière-obscurité de 12h / 12h (07 :19h). Les animaux sont acclimatés à la présence de l'expérimentateur qui les pèse et les examine tous les jours. L'eau de breuvage (stérile) ainsi que la nourriture (stérile) sont fournis *ad libitum*. Pour réduire et éviter le stress et assurer le bien-être des animaux, chaque cage est enrichie avec des objets (cabane en carton) et la litière de chaque cage est changée régulièrement.

6119. L'objectif de cette étude est de déterminer la biodistribution *in vivo* de trois polysaccharides, en vue d'un dépôt de dossier à l'ANSM et à la FDA. Ces polysaccharides sont développés pour la régénération matricielle de tissus endommagés, comme des lésions cutanées, oculaires ou vasculaires. Pour ce faire, les molécules seront radiomarquées pour évaluer leur biodistribution *in vivo* par des techniques de comptage tissulaire et d'imagerie isotopique *in vivo* sur des animaux sains, sur des animaux présentant un accident vasculaire cérébral et sur des animaux présentant une ischémie myocardique.

L'utilisation de l'imagerie *in vivo* pour évaluer la biodistribution d'un médicament permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires en comparaison des méthodes standards avec sacrifice des animaux. Elle permet également de renforcer la pertinence scientifique en réalisant un suivi longitudinal, le même animal étant son propre témoin tout au long de l'étude. Toutes les procédures seront réalisées en respectant le bien-être des animaux : l'acquisition des images *in vivo* n'étant pas douloureuse, l'animal est maintenu sous anesthésie gazeuse légère uniquement pour limiter les mouvements. Lors de l'induction des ischémies cérébrales et cardiaques, les mesures nécessaires seront prises pour limiter la douleur et le stress des animaux par l'utilisation d'anesthésiant et d'analgésique.

Cette évaluation nécessite l'utilisation de 168 rats de type Wistars et 120 rats de type Sprague-Dawley.

6120. Ce projet de recherche translationnelle vise à évaluer le Scanner Spectral à Comptage Photonique pour la détection de métastases péritonéales de cancer colorectal à partir d'un modèle de rat. La réalisation de ce projet se fera sur une durée maximale de 2 ans.

L'apparition de métastases péritonéales des cancers digestifs ou ovariens est communément appelée carcinose péritonéale. Une telle extension a longtemps été considérée comme une contre-indication à une prise en charge curative des patients. Néanmoins, traiter précocement la maladie à des stades infra-cliniques, non symptomatiques, permet actuellement d'envisager de changer ce paradigme. L'imagerie trouve alors une place fondamentale dans cette optique. Outre l'établissement du diagnostic, elle permet de réaliser un bilan d'extension des lésions à différentes étapes du traitement. Cette cartographie, de plus en plus précise, permet de choisir le traitement adapté (chirurgie et/ou chimiothérapie) et d'en étudier les effets. La chirurgie à visée curative associant la résection complète des lésions de carcinose à une chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) est un traitement lourd grevé d'une importante morbidité post-opératoire et d'une mortalité de 3% imposant donc une sélection drastique des patients. C'est pourquoi l'imagerie joue un rôle déterminant dans le choix du traitement et qu'elle doit nous fournir une image la plus précise possible.

Le scanner conventionnel, offrant une haute résolution spatiale, est l'examen de référence pour l'exploration des atteintes péritonéales. Cependant, ses capacités de détection pour les petites lésions inférieures à 0,5-1 cm (qui représentent souvent la majorité des lésions) restent très limitées. L'IRM et PET-scanner ne sont pas plus performants afin de détecter ces petites lésions. Seule une exploration chirurgicale invasive, longue et minutieuse de l'entière cavité abdominale peut révéler ses lésions.

Le Spectral Photon Counting Computed Tomography (SPCCT) est un système innovant (seulement trois prototypes actuellement en fonction dans le monde). Il rend possible la réalisation, en plus d'une imagerie scannographique à ultra-haute résolution spatiale (200µm), d'une spectrométrie *in vivo*. Celle-ci permet de quantifier dans une structure un certain nombre de produits de contraste injectés tel le gadolinium ou l'iode venant se fixer électivement au sein des lésions tumorales. Une quantification absolue de la distribution de ces produits au sein des tissus deviendrait possible. Cette technique pourrait ainsi théoriquement permettre de combiner une analyse anatomique, fonctionnelle et moléculaire permettant de détecter de manière très précoce et précise des lésions invisibles à l'imagerie actuellement.

Ce tout nouveau scanner de dernière génération visera ainsi à remplacer à terme l'imagerie conventionnelle et permettra on l'espère de détecter la carcinose à des stades où l'option curative est toujours possible.

Application de la règle des 3R et nombre d'animaux :

En accord avec la règle de Remplacement, des tests préliminaires sur fantômes inertes ont été effectués afin d'évaluer la performance du scanner spectral. Ces essais ont montré des résultats prometteurs mais à ce stade l'utilisation d'un organisme entier reste indispensable via notamment l'utilisation de produits de contraste.

Le modèle de carcinose péritonéale utilisant des cellules CC531 dérivant de tumeur colique chez le rat WAG-RIJ est connu et utilisé depuis plusieurs années afin d'étudier la carcinose. De plus, la taille du rat est également optimale par rapport au champ de vue du SPCCT.

Ainsi, 28 rats WAG-RIJ seront utilisés pendant ce projet dont seulement 20 animaux pour la phase pathologique. Les animaux sains pourront être réutilisés pour un autre projet.

La connaissance et la bonne reproductibilité du modèle animal permettront de réduire le nombre d'animaux sur le modèle pathologique.

L'étude a été fractionnée en deux phases distinctes précédées d'une phase pilote sur animaux sains afin de définir le meilleur protocole d'imagerie et toujours afin de réduire le nombre d'animaux au décours de la phase pathologique. Après induction d'une carcinose d'origine colique chez le rat WAG-RIJ, une phase d'évaluation diagnostique de la carcinose sera comparée à l'exploration chirurgicale couplée à l'histologie comme examen de référence. Cette phase ne démarrera que si le pilote a été concluant. Il n'est pas prévu et non nécessaire de faire évoluer la carcinose à des stades évolués de la maladie pouvant engendrer un degré de souffrance sévère. Un raffinement continu des pratiques d'expérimentations sera pratiqué. Les rats seront hébergés dans des cages aux normes avec à disposition des formes d'enrichissement (nids, igloos) afin de réduire le stress.

6121. La consommation de viande est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques ont été consolidées par des études du laboratoire à l'aide de modèle animaux.

Ces études animales ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : des travaux précédents ont permis de démontrer que le fer sous forme héminique était responsable de cet effet en catalysant un fort stress oxydant dans la lumière intestinale. L'utilisation de cellules en culture a également permis de montrer que les produits d'oxydation des graisses, comme le 4-hydroxynonéal (HNE), que l'on trouve au niveau de la lumière du tube digestif lors de ce stress oxydant étaient plus toxiques pour les cellules saines que pour les cellules portant déjà une mutation, favorisant ainsi la prolifération de ces cellules mutées. Ce travail a permis de proposer une hypothèse mécanistique pour expliquer l'effet promoteur des produits à base de viande sur la carcinogenèse colorectale.

Cependant, aucun travail n'a aujourd'hui apporté la preuve de concept *in vivo* de l'effet des produits terminaux de lipoperoxydation sur la cancérogénèse colorectale, dans un contexte colique où les cellules interagissent avec le système immunitaire, nerveux, la flore et la présence de mucus.

Le but de ce projet sera donc d'évaluer *in vivo* chez le rat, sur une étude court terme, les conséquences d'un apport par voie orale de HNE, dans l'aliment, sur les paramètres d'inflammation, la génotoxicité et la flore colique. Le nombre d'animaux a été optimisé de façon à avoir une puissance statistique suffisante (64 rats seront utilisés au total ; 8 animaux par groupe). Ce protocole expérimental inclut des régimes alimentaires différents. Les animaux ne subiront ni administration de produit, ni prélèvement invasifs pendant la toute la durée du projet. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnelle, dans un environnement contrôlé, avec une surveillance et des soins quotidiens par du personnel qualifié, leur assurant des conditions optimales de bien-être et de santé.

6122. Le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer le plus fréquent dans le monde. Des métastases hépatiques apparaissent chez 50% des patients. Le traitement chirurgical à visée curative qui représente le traitement de référence, ne peut être réalisé que dans moins de 30% des cas. De plus, la chimiothérapie, par voie systémique ou régionale, et les biothérapies ciblées, ont une efficacité de traitement limitée par leur toxicité et par l'acquisition d'une résistance au traitement. Depuis quelques années, les traitements locorégionaux thermiques comme les radiofréquences (RFA) sont très utilisés dans la pratique clinique pour traiter les tumeurs primaires et métastatiques du foie quand le traitement chirurgical n'est pas réalisable. Il a été observé une augmentation de la réponse immune chez des patients traités par RFA. Cependant des taux élevés de récurrence locale et systémique compromettent son efficacité. D'autre part, beaucoup de travaux ont été consacrés au développement d'immunothérapies anti tumorales, aboutissant à la validation de vaccins contre le cancer.

L'objectif de notre projet consiste à évaluer une nouvelle stratégie thérapeutique anti tumorale en associant un traitement thermique par RFA à une immunothérapie. Le cancer est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement le microenvironnement tumoral, permet d'étudier l'efficacité de ces traitements. L'efficacité de notre stratégie sera évaluée sur un modèle murin métastatique de cancer colorectal sous-cutané, bien caractérisé et largement étudié comme un modèle mimant le microenvironnement métastatique.

Dans un premier temps, le système immunitaire des animaux sera stimulé par une première vaccination. Trois semaines plus tard, les animaux recevront par une implantation sous cutanée un fragment de cellules cancéreuses d'origine colorectales transformées pour être luminescentes (CT26 luc). Cette implantation mimera la tumeur primaire colorectale métastatique retrouvée en clinique. Au stade de croissance tumorale souhaité, le traitement des tumeurs primaires sera réalisé : il consistera à réaliser le traitement thermique par RFA en association à une injection intra tumorale d'un thermo-gel contenant des agents immunomodulateurs. Les animaux ne développent pas de tumeurs secondaires métastatiques à ce stade. Ils recevront en parallèle, par injection sous cutanée, réalisée à distance du site d'implantation de la tumeur primaire, des cellules CT26luc. Enfin, des injections sous-cutanées d'anti-PD1, reconnu pour empêcher l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T par les cellules tumorales, compléteront le traitement. Les animaux seront imagés tous les 3 jours après le traitement afin de suivre l'évolution tumorale. La rate, les ganglions drainants et les tumeurs secondaires seront prélevés afin d'analyser la réponse immune au traitement.

Nous utiliserons 221 souris Balb/C femelles pour évaluer cette stratégie thérapeutique.

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, nous limiterons le nombre d'expérience et de souris nécessaires. Nous avons préalablement évalué *in vitro* plusieurs formulations thermosensibles pour ne tester chez l'animal que la formulation finale. De plus, l'utilisation de l'imagerie optique nous permet de réaliser en temps réel le suivi de l'évolution tumorale. Cette technique non invasive nous permet ainsi de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Une surveillance journalière sera assurée après la chirurgie. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les traitements et les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale. De plus, des antalgiques seront systématiquement donnés après les interventions chirurgicales. Enfin, des points-limites ont été établis qui entraîne l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme, les résultats de cette étude nous permettront de déterminer l'efficacité de l'association de la radiofréquence et de l'immunothérapie dans le traitement des métastases. Ils pourraient conduire à un essai clinique chez l'homme pour intégrer cette stratégie dans le traitement du cancer colorectal métastatique.

6123. Le projet a pour but d'évaluer l'innocuité et/ou l'efficacité de candidats médicaments chez les espèces aviaires ainsi que leur impact sur l'environnement (animaux en contact de même espèce ou d'espèce différente).

Pour qu'un médicament soit commercialisé, il faut démontrer que celui-ci présente un bilan risques/bénéfices favorable. Les études nécessaires comprennent, entre autres, des études menées sur les animaux. Ces études sont réalisées sur l'espèce cible du produit développé (ici les espèces aviaires) ou sensible à la (aux) souche(s) utilisée(s), ce qui permet de s'approcher au maximum des conditions réelles d'utilisation. Cependant, des études menées sur des espèces d'oiseaux différentes de celle de l'espèce cible peuvent être également requises.

Ces différentes études sont exigées par la Pharmacopée Européenne et les réglementations nationales et internationales concernant les vaccins.

Avantages/dommages :

La finalité de ces études est la mise au point de médicaments d'un niveau d'innocuité et d'efficacité satisfaisant. Ceux-ci sont essentiels en élevage de volaille afin de protéger les animaux contre les maladies infectieuses et de garantir les performances zootechniques et économiques.

Les procédures peuvent occasionner du stress et de la gêne en fonction de l'occurrence des prélèvements et administrations. Afin de limiter les contraintes engendrées par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique des produits testés, sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 15 800 poules (comprenant les poules pondeuses et les poulets), à 250 canards et à 450 dindes.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Une série de tests analytiques permet de garantir un certain niveau de sécurité pour les animaux recevant le produit. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie lorsque cela est possible.

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

Raffinement : Dans ce projet, aucune douleur ou souffrance n'est attendue. Le personnel est formé et compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans son état physiologique optimal. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux afin de maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, les animaux sont hébergés en groupe. La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

6124. Les hépatites sont des inflammations du foie, causées le plus souvent par des infections virales ou des hépatotoxines (l'alcool notamment). Si l'on considère également leurs complications les plus communes (cirrhose et cancer), les hépatites causent plus d'un million de morts par an dans le monde.

La première phase des hépatites de causes virales est la phase dite aiguë. Il n'existe à ce jour aucun traitement et, si la plupart des hépatites aiguës se résolvent d'elle-même, certaines peuvent devenir chroniques et entraîner des complications mortelles. L'hépatite C notamment devient chronique dans 65 % à 85 % des cas, ce qui conduit à une cirrhose dans environ 20 % des cas dans les pays occidentaux. C'est d'ailleurs la première cause d'hépatite chronique et de cirrhose en Europe et en Amérique du Nord. En France, 1 % de la population serait porteuse du virus.

Les hépatites autoimmunes sont une forme chronique rare des hépatites, représentant moins de 6 % des cas en France : on compte 50 à 200 cas pour un million d'habitants.

L'adénosine est considérée comme un candidat médicament prometteur pour le traitement des hépatites aiguë et auto-immune. En effet, l'adénosine a un effet immunosuppresseur qui permettrait de résorber une réponse inflammatoire inappropriée ou trop prolongée. Cependant, son utilisation clinique est extrêmement limitée car, si cette molécule est injectée par voie intraveineuse, elle est dégradée en quelques secondes dans la circulation sanguine.

Ce problème peut être résolu grâce au concept de « squalénisation ». Ce concept consiste à protéger l'adénosine en le couplant à un dérivé lipidique naturel, le squalène, qui est un précurseur du cholestérol. On peut alors former des nanoparticules (NPs), qui peuvent être administrées par voie intraveineuse et relarguent progressivement l'adénosine dans l'organisme.

Récemment, il a été montré que la squalénisation de l'adénosine permettait de soigner des lésions consécutives à une perturbation de l'oxygénation cérébrale entraînant une réaction inflammatoire sévère. A l'occasion de cette étude, il a également été observé que le traitement par les NPs d'adénosine-squalène (AdSQ) entraînait une accumulation de la molécule dans le foie.

Ces résultats, couplés aux résultats d'autres équipes de recherche sur l'effet anti-inflammatoire de l'adénosine, amènent à penser que les NPs d'AdSQ pourraient avoir une action protectrice sur le foie subissant une hépatite aiguë ou auto-immune. Nous formulons l'hypothèse que la « squalénisation » de l'adénosine permettrait d'apaiser la réaction inflammatoire inappropriée entraînée par ces hépatites.

Ainsi, le but de cette étude est d'évaluer l'activité des nanoparticules d'adénosine squalène sur le système hépatique, plus précisément l'action protectrice de cette molécule sur le foie subissant une lésion d'origine inflammatoire.

Cette lésion sera induite chez des souris adultes males par une injection unique de concanavaleine A (ConA). Ce modèle est connu et bien décrit dans la littérature. Les données cliniques de patients humains permettent de savoir que les lésions induites par l'injection de ConA n'induisent pas de souffrance avant l'apparition de complications. Les souris seront donc surveillées avec attention et prises en charge en cas d'apparition d'effets secondaires.

L'hépatite étant une inflammation, elle est due à des interactions complexes entre différents types cellulaires (notamment les cellules du foie et les cellules immunitaires). Il est donc indispensable de travailler sur un organisme entier afin de reproduire au mieux la pathologie humaine et ainsi déterminer au mieux le potentiel de notre agent thérapeutique. De plus, dans leur transport depuis le site d'administration, les nanomédicaments passent à travers et sont potentiellement modifiés par plusieurs organes et systèmes, tels les systèmes humoraux et immunitaires : ces multiples processus ne peuvent pas être reproduits *in vitro*. De telles études doivent donc être menées chez l'animal.

Une planification statistique minutieuse a permis de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité de l'étude. Au cours de chaque procédure, on comparera les effets des NPs d'AdSQ avec ceux des NPs de squalène pur (non lié à l'adénosine), de l'adénosine libre (non liée au squalène) et d'un placebo. La première procédure vise à mettre au point le modèle sur un nombre restreint de souris, tandis que la deuxième procédure vise à démontrer l'effet protecteur des NPs. Le nombre d'animaux total utilisé pour ce projet est de 105. Les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'animaux socialement compatibles.

6125. L'arthrose (OA) est une maladie très fréquente qui touche les articulations, notamment les genoux, et qui est caractérisée par une dégradation progressive du cartilage articulaire, sans infection et avec peu d'inflammation locale. Dans une articulation affectée, la surface du cartilage se fissure, s'effrite et finit par disparaître. Cela s'accompagne du développement d'excroissances osseuses (les « becs de perroquet ou ostéophytes »). L'ensemble de ces lésions conduit à un enraidissement des articulations qui nuit aux mouvements. Outre l'âge, l'obésité (Surpoids et syndrome métabolique) est un facteur aggravant de la pathologie arthrosique. Afin de dissocier les composantes de l'obésité : des souris seront centrifugées afin de mimer le surpoids sans le syndrome métabolique et d'autres recevront un régime alimentaire obésogène (riche en graisse). Aucun traitement médicamenteux efficace de l'arthrose n'est actuellement disponible car les mécanismes de survenue de cette maladie sont mal connus.

L'os situé directement sous le cartilage (os sous-chondral) est impliqué dans les mécanismes qui conduisent à l'arthrose et il a été observé que des vaisseaux sanguins s'y développaient en excès. L'hypothèse est que ces vaisseaux jouent un rôle fondamental dans cette maladie. Cependant, peu de données existent sur quand et comment ces vaisseaux se développent.

Cette étude a pour but de tester l'effet d'un traitement anti-angiogénique chez des souris arthrosiques obèses ou non et cela pour une période de 8 semaines ainsi qu'une contre mesure à l'effet de l'arthrose par vibration légère corps entier.

De plus, il existe une relation os/muscle très étroite dans l'OA dont les mécanismes seront étudiés lors de la réalisation de ce projet. L'analyse de la cinétique du développement des vaisseaux dans l'os sous chondral ne peut être réalisée :

- *in vitro* : car c'est l'interaction des tissus de l'articulation (cartilage, os, vaisseaux) sous l'influence de facteurs, dont beaucoup sont systémiques, qui est étudiée ici. Des co-cultures cellulaires ne pourraient nous donner ce genre d'information,

-chez l'Homme : car les prélèvements effectués le sont lors de mise en place de prothèse c'est-à-dire au stade le plus tardif d'évolution de la maladie.

Afin de mener à bien ce projet, 180 souris mâles matures sur le plan squelettique seront nécessaires. Ce nombre comprend les animaux pour effectuer les différents groupes (contrôle, obèse, centrifugé, vibré, arthrosique ou non) ainsi que les animaux indispensables aux développements techniques. Ce nombre ne peut-être plus diminué sans risque de mettre en péril l'interprétation statistique.

Lors de la réalisation de cette étude, chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant/anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 3); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition *ad libitum* et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

6126. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le 5ème cancer le plus fréquent au monde et un des plus meurtriers. Dans la plupart des cas, les CHCs sont une complication tardive d'une maladie chronique du foie, elle-même due à une infection par les virus de l'hépatite B ou C, ou l'excès d'alcool. Plus récemment une augmentation de la prévalence des CHC dans les populations atteintes d'obésité ou de diabète de type 2 suggère une implication potentielle de l'hyper insulinémie associée à l'insulino-résistance dans le CHC. Aujourd'hui, les seuls traitements efficaces du CHC sont la résection de la tumeur et la transplantation hépatique applicables qu'à un faible nombre de cas. Il est donc nécessaire de trouver d'autres pistes pour le traitement des CHC.

La Reptine est une protéine cellulaire surexprimée dans 75% des CHC et associée à un mauvais pronostic. Si son expression est bloquée les tumeurs régressent suggérant que la Reptine pourrait être une bonne cible thérapeutique. A ce jour, il n'y a aucune étude concernant le rôle de la Reptine endogène dans un organisme mammifère entier.

Notre objectif est de comprendre les fonctions de la Reptine dans la physiologie et la pathologie hépatique par des approches reposant essentiellement sur l'utilisation de souris transgéniques obtenues par la stratégie Cre-LoxP inducible par injection de tamoxifène, ciblée dans l'hépatocyte. Cette stratégie justifie le choix de la souris, qui est l'espèce de choix pour cette transgénèse particulière. Il n'existe pas de méthode alternative pour l'objectif de ce projet. La souris est un système biologique qui reproduit quasi entièrement les conditions cliniques, analytique et /ou moléculaire de notre objet d'étude. Dans ce projet nous évaluerons, si la délétion recombinante de la Reptine au niveau du foie de souris adulte, induit des modifications du comportement alimentaire et de la réponse métabolique. Nous utiliserons pour cela, 80 souris. Celles-ci seront placées sous un régime alimentaire standard ou sous un régime hypercalorique, régime connu pour induire l'obésité.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes (directive 2010/63/UE) et françaises (Décret no 2013-118), et respectent les standards de soin et de bien-être des animaux : régulation de la température et de l'hygrométrie et enrichissement des cages. Cette étude sera réalisée en respectant le bien-être animal et sous le contrôle d'un vétérinaire. Nous prendrons aussi en compte la règle des 3 R (remplacer, réduire et raffiner), les études *in vitro* ne peuvent pas remplacer l'utilisation d'animaux, étant donné l'aspect comportemental du projet. Des calculs statistiques de puissance ont été effectués lors de la conception du protocole expérimental pour estimer le nombre d'animaux (taille des échantillons n=20 animaux) nécessaire et

suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un effort tout particulier sera fourni pour réduire la souffrance des animaux.

6127. L'arthrose est une maladie dégénérative du cartilage des articulations. Elle entraîne des douleurs et une perte fonctionnelle de l'articulation. On estime à plus de 39 millions de personnes dans l'Union Européenne les patients atteints par l'arthrose. En 2020, ce chiffre aura probablement doublé. Cette maladie est devenue un véritable problème de santé publique compte tenu du vieillissement de la population. Par ailleurs cette maladie est aussi un problème vétérinaire car elle touche aussi les animaux notamment le chien et le cheval. A ce jour, aucun traitement n'est susceptible de guérir cette maladie. L'administration d'acide hyaluronique permet au mieux de retarder quelques temps la mise en place d'une prothèse. L'administration de Plasma Riche en Plaquette (PRP) est l'objet actuel d'essai clinique et semble avoir des effets bénéfiques sur le ralentissement de la maladie mais pas la réparation du cartilage. Les effets thérapeutiques de l'administration expérimentale de cellules souches mésenchymateuses (CSM) chez l'animal ouvre un nouvel espoir d'application chez l'homme. Cependant les essais actuels utilisent des cellules CSM isolées et amplifiées par une étape de culture longue et coûteuse peu compatible avec un usage à grande échelle.

Notre objectif est de préparer un essai clinique de thérapie cellulaire du genou arthrosique sans recours à la culture des CSM. Nous avons aujourd'hui mis au point cette thérapie de l'arthrose du genou dans un modèle expérimental chez la souris. Pour permettre le transfert à l'homme, nous devons valider chez la brebis cette stratégie thérapeutique.

Nous envisageons plus précisément dans ce projet : 1) de mettre au point le modèle d'arthrose chez la brebis; 2) d'évaluer l'effet de l'administration dans le genou d'une suspension cellulaire enrichie en CSM, préparée extemporanément à partir du tissu adipeux ou de la moelle osseuse.

Le modèle d'arthrose expérimentale du genou induite par une lésion mineure du cartilage chez la brebis a déjà été publié. Il reste à évaluer la cinétique d'apparition de la maladie dans l'environnement expérimental (bloc opératoire où se fera la chirurgie, ferme d'élevage). Nous aurons pour cette mise au point besoin de 9 animaux. L'évaluation de la thérapie cellulaire nécessitera 18 animaux répartis en 6 groupes. Trois animaux supplémentaires sont prévus en cas de problème.

Au total le projet nécessitera 30 brebis.

Remplacement : Le modèle expérimental chez la brebis ne peut pas être remplacé par des expériences *in vitro* car le projet se propose de réaliser un essai préclinique d'une maladie complexe. Les expériences sur des animaux de tailles inférieures ont été réalisées avec succès mais pour pouvoir transférer le protocole thérapeutique à l'homme, il est indispensable de justifier de données expérimentales chez le gros animal. Le modèle ovin a été sélectionné en raison de la littérature démontrant l'intérêt de ce modèle pour l'étude de l'arthrose du genou.

Réduction : Le nombre d'animaux minimum a été défini au regard des travaux similaires publiés utilisant les CSM de culture et afin de pouvoir réaliser une analyse statistique des résultats fiable.

Raffinement : La chirurgie est réalisée dans un bloc opératoire neuf par une équipe composée d'anesthésiste, chirurgien et assistant formés. Les animaux sont anesthésiés par les techniques d'anesthésie vétérinaires et la souffrance possible de l'animal est réduite par une prise en charge pré et post opératoire. Les animaux sont surveillés jusqu'à leur réveil et suivi quotidiennement sur le site d'expérimentation jusqu'au rétablissement de l'animal puis en ferme d'hébergement.

6128. Depuis 2003, le cancer est la principale cause de décès en France dont l'incidence ne cesse d'augmenter. La plupart des chimiothérapies anticancéreuses actuelles présentent une toxicité systémique importante limitant l'augmentation des doses administrées et donc des résultats thérapeutiques.

Les nanomédicaments, qui incorporent des molécules médicamenteuses dans des véhicules de taille nanométrique (milliardième de mètre), représentent un espoir important pour le traitement de cette pathologie de par leur capacité à cibler des tissus ou des cellules malades.

Dans ce contexte, il a été récemment démontré que l'on peut construire des nanomédicaments très efficaces, après couplage de la gemcitabine (molécule anticancéreuse) au squalène qui est lipide proche du cholestérol naturellement présent chez l'Homme. Les nanomédicaments à base de squalène-gemcitabine ont déjà démontré une activité anticancéreuse très supérieure à la gemcitabine libre sur de nombreux modèles de tumeurs expérimentales (murins et humains).

La structure du squalène ressemble à celle du cholestérol et des résultats déjà obtenus sur ce dernier nous permettent de faire l'hypothèse que ces nanomédicaments, contenant le squalène, pourraient être transportés dans la circulation par les mêmes molécules en charge du transport du cholestérol, c'est-à-dire les lipoprotéines. On distingue deux sortes de lipoprotéines : celles de densité élevée qui transportent le cholestérol vers le foie et celles de faible densité, chargées d'apporter du cholestérol aux cellules et plus connu sous le nom de « mauvais cholestérol ». Les cellules cancéreuses, en division perpétuelle, nécessitent un apport accru en cholestérol et sont capables de capter en grande quantité les lipoprotéines de faible densité transportant le cholestérol.

Si l'hypothèse que le nanomédicament à base de squalène-gemcitabine se lie aux lipoprotéines de faible densité est correcte cette interaction pourrait expliquer son accumulation très importante dans les cellules cancéreuses et son efficacité anti tumorale.

Le but de ce projet est de modéliser par une approche *in vivo* l'interaction entre les nanomédicaments à base de squalène et les lipoprotéines de faible densité, et d'évaluer leur répartition dans l'organisme entier. Pour cela, une étude de bio-distribution dans un modèle de cancer induit chez la souris sera effectué dans 3 modèles biologiques : chez la souris normale et chez deux lignées de souris génétiquement modifiées présentant des dysfonctionnements de leur métabolisme lipidique engendrant un taux élevé de cholestérol. Cette étude, en comparant le modèle normal et les modèles pathologiques, permettra de mesurer les quantités de principe actif qui circulent dans le sang et qui sont accumulés dans les organes et la tumeur après injection et ainsi permettra de mieux connaître le rôle des lipoprotéines dans le transport des nanomédicaments à base de squalène.

Ce médicament pourrait donc représenter une nouvelle stratégie thérapeutique qui utilise les lipoprotéines de faible densité (« le mauvais cholestérol ») en qualité de transporteur du nanomédicament jusqu'aux tumeurs en tirant parti du besoin de celles-ci en cholestérol. Cette démarche s'inscrit complètement dans l'étude d'une stratégie thérapeutique qui pourrait être transposée aux patients.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (remplacement, réduction et raffinement) pour l'utilisation des animaux en recherche.

Il n'est pas possible de modéliser la bio-distribution des médicaments autrement que par une étude *in vivo* qui reproduira la complexité d'un organisme entier. Seule cette approche permettra d'étudier le passage des médicaments du compartiment sanguin vers les organes et la tumeur et ainsi mesurer l'accumulation dans les différents tissus.

Nous avons réalisé des expériences préliminaires en cultures cellulaires qui montrent le rôle du récepteur aux LDL dans l'accumulation des médicaments à base de squalène dans les cellules. Les études *in vitro* ont permis aussi le criblage de différentes lignées cellulaires cancéreuses et une seule lignée sera testée *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre des animaux. Les souris recevront une injection sous cutanée de cellules cancéreuses et quelques jours plus tard une injection intraveineuse de médicament (une fois la tumeur développée).

Une planification statistique minutieuse permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Le bien-être des animaux (raffinement) est également respecté : les animaux seront hébergés en groupe, et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress. Des méthodes d'anesthésie sûres et efficaces seront utilisées pour exécuter toute intervention douloureuse.

Pour la réalisation de cette étude nous prévoyons d'utiliser un nombre total de 348 souris.

6129. La candidose systémique est une infection mycosique opportuniste à *Candida*, levure commensale du tractus digestif dont la pathogénicité s'exprime en présence de facteurs de risque liés à l'hôte ou facteurs extrinsèques le plus souvent d'origine iatrogène: antibiothérapie à large spectre, chirurgie du tube digestif, hémopathies malignes, infection à VIH/SIDA, diabétiques, transplantés d'organe, grands brûlés, cathéters veineux. Ces infections disséminées se déclarent par une fièvre résistante aux antibiotiques et choc septique avec manifestations diverses (cutanées, cardiaques, cérébro-méningées, ostéo-articulaires, hépatospléniques, oculaires...)

Nous proposons de développer un modèle expérimental d'infection systémique à *Candida albicans* chez la souris afin de comprendre les mécanismes immunopathologiques impliqués dans la défense contre cette infection et les facteurs de sensibilité liés à l'hôte.

De nombreux récepteurs à la surface des cellules hôtes reconnaissent des motifs moléculaires du pathogène, ce qui induit l'activation de la réponse immunitaire. Nous étudierons en particulier le rôle du récepteur Dectin-1 grâce à des souris génétiquement altérées (Dectin KO). La règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) sera respectée tant que possible mais on comprend aisément que ce type de recherche (sur animaux génétiquement modifiés) ne peut être remplacée.

L'infection systémique se fera par inoculum standardisé en intraveineux (injection d'une quantité définie de *Candida sp* au niveau de la veine latérale de la queue, protocole décrit et bien maîtrisé dans de nombreuses études).

Après infection, chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont.

Au cours du protocole, nous effectuerons des prélèvements sanguins sur les souris pour suivre l'évolution de l'infection fongique et pour évaluer la nature de la réponse immunitaire (molécules mises jeu dans la défense de l'hôte).

Le nombre total de souris a été fixé à 100. Cet effectif a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats.

Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 3); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

6130. Les Paraostéoartropathies (POA) sont définies par la formation ectopique de tissu osseux aux dépens du tissu musculaire péri-articulaire. Les POA peuvent apparaître après une lésion du système nerveux central (traumatisme crânien, lésion de la moelle épinière), mais également survenir chez les grands brûlés et un long séjour en réanimation semble augmenter leur risque de survenue. Les POA sont à l'origine de douleurs importantes avec inflammation locale et sont localisées au niveau des articulations (hanche, coude, genou et épaule), conduisant à une perte d'amplitude articulaire jusqu'à l'ankylose complète. L'unique traitement proposé à ce jour est la chirurgie d'exérèse avec risque de récurrence.

Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement des POA chez l'homme, nous souhaitons étudier le rôle de populations cellulaires musculaires qui sont susceptibles d'être impliquées dans la genèse des POA :

- les cellules satellites représentent la principale population de cellules à l'origine des cellules musculaires et semblent également posséder un potentiel ostéogénique *in vitro*.
- d'autres cellules, principalement situées dans le tissu conjonctif musculaire, peuvent également contribuer à la régénération du muscle, notamment les cellules souches dites « muscle-derived stem cells ».
- enfin, les macrophages pourraient aussi jouer un rôle dans le développement de la pathologie comme le suggèrent nos résultats *in vitro*.



Nous avons déjà identifié et caractérisé, *in vitro*, les cellules issues du muscle ayant une capacité de différenciation ostéoblastique chez des patients atteints de POA. La suite de notre travail consiste donc à greffer les cellules identifiées précédemment dans des biomatériaux implantés sous la peau de la souris, servant ainsi de support (procédure expérimentale n°1). La greffe à des animaux est indispensable car il s'agit de la seule méthode pour valider le potentiel de différenciation des cellules musculaires en cellules ostéoblastiques au sein d'un microenvironnement favorable, les méthodes développées *in vitro* n'étant pas suffisantes.

Afin d'étudier le rôle du processus inflammatoire dans le développement des POA, nous utiliserons un modèle de souris chez lesquelles l'inflammation médiée par les macrophages est inhibée par injection de liposomes chargés en clodronate (procédure expérimentale n°2).

Aucune procédure de remplacement permettant d'éviter le recours à l'expérimentation animale n'est connue à ce jour. Nous tentons au maximum de raffiner toutes nos expérimentations de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux et d'annihiler ou de diminuer le plus possible le stress et la douleur.

Ce projet nécessite 3 groupes de 28 souris et un groupe de 40, ainsi le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet sera de 124 souris.

6131. La peau, indispensable au maintien de la survie de l'organisme, assure une fonction de barrière, de protection vis-à-vis de l'environnement extérieur, de régulation de la température corporelle et participe à la défense immunitaire. Lors d'agressions du revêtement cutané comme les brûlures (d'origine thermique, chimique, électrique ou radiologique...) la perte de l'intégrité de la peau peut induire un profond déséquilibre physiologique pouvant aller jusqu'au décès, comme dans le cas par exemple d'infection bactérienne généralisée qui est fréquente en cas de brûlure importante du corps humain.

Le plasma froid est un gaz ionisé (les molécules le constituant sont chargées), avec une température proche de la température ambiante. Son application au domaine médical est un sujet en pleine expansion depuis quelques années. En effet, les dispositifs plasmas sont sources en milieu liquide d'espèces réactives contenant entre autres de l'oxygène et de l'azote, qui sont les atomes constituant majoritairement l'air ambiant. Ces molécules sont réactives car elles réagissent facilement et rapidement avec des cibles diverses et variées comme des solides, des liquides mais aussi des cellules ou des tissus biologiques. De récentes études ont ainsi montré que les plasmas, par le biais de ces molécules réactives, permettent de promouvoir la maturation des cellules en cellules fonctionnelles, le développement tissulaire, induisent l'angiogenèse, c'est-à-dire la création de nouveaux vaisseaux sanguins, et ont des effets bactéricides. Ces plasmas peuvent être utilisés directement pour traiter une cible (traitement direct) ou bien indirectement pour traiter un liquide qui sera appliqué ultérieurement sur la cible (traitement indirect). Ces liquides sont appelés milieux activés par plasma (PAM, plasma activated media).

Les objectifs de notre projet sont doubles. Premièrement, il s'agit de montrer les effets des PAMs puis du traitement direct par plasma sur la cicatrisation plaie cutanée créée par biopsie de la peau chez la souris. Ces deux essais expérimentaux représentent deux essais différents avec des groupes témoins adaptés à chaque technique. La biopsie, d'un diamètre de 6 millimètres sera effectuée avec un emporte-pièce à biopsie appelé "Biopsie Punch". Deuxièmement, nous chercherons à mettre en place un protocole de brûlure cutanée chez la souris pour de futures expériences *vivo*. Pour ce faire, nous chercherons à optimiser un protocole connu et maîtrisé mais adapté au rat en travaillant sur un paramètre : la température de la plaque chauffante utilisée pour induire la brûlure.

Il n'existe pas de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour cette étude où 129 souris seront utilisées en tout. En effet, le plasma, en distribuant des espèces actives, agit non seulement sur les cellules cibles mais aussi sur l'équilibre moléculaire *in vivo* à la fois localement mais aussi de manière plus diffuse autour de la zone traitée. Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, la précision et la reproductibilité de la technique aura été validé précédemment sur des cellules cutanées isolées *in vitro*. Les procédures seront effectuées sous anesthésie et analgésie et des points limites ont été fixés pour arrêter l'expérimentation dans le cas de souffrance ou de la détérioration de l'état des animaux.

6132. Le cancer du poumon ou cancer bronchique est le cancer le plus fréquent dans le monde et en France où il touche environ 40 000 personnes par an et représente la première cause de décès par cancer. Le taux de survie à 5 ans de l'adénocarcinome bronchique est de 5% due en partie à une résistance innée ou acquise de ces tumeurs aux traitements anti-cancéreux. L'analyse génétique des adénocarcinomes bronchiques a mis en évidence plusieurs oncogènes impliqués dans le développement de ces cancers incluant les mutations de la protéine KRAS. KRAS est une protéine impliquée dans la transformation, la prolifération et la survie des cellules cancéreuses et l'incidence de la mutation KRAS dans le cancer CBNPC varie de 15 à 30%. La présence d'une mutation KRAS est associée à un mauvais pronostic due notamment à la résistance des tumeurs aux chimiothérapies et radiothérapies. Malgré de considérables efforts dans le développement de thérapies ciblant directement KRAS ou ses voies de signalisation, aucune approche n'a pour l'instant été concluante chez les patients. Il a été précédemment démontré que les protéines de la famille des intégrines, protéines transmembranaires permettant à la cellule d'interagir avec le microenvironnement sont impliquées dans la survie des tumeurs pulmonaires exprimant l'oncogène KRAS. De plus, la protéine CD98hc qui permet la régulation des intégrines est également impliquée dans la tumorigénèse des cancers de la peau exprimant la mutation RAS et permet la propagation des cellules leucémiques grâce à ses fonctions de régulateurs des voies intégriniques.

Notre hypothèse de travail est donc que CD98hc est impliqué dans la tumorigénèse et la progression des cancers pulmonaires exprimant la mutation KRAS. Le rôle de CD98hc dans la tumorigénèse pulmonaire sera étudié à l'aide de deux modèles murins (le modèle KRASG12D et le modèle KRASG12D, p53fl/fl) permettant de mimer les étapes d'initiation et de progression des cancers pulmonaires humains. Dans cette étude nous allons utiliser 240 souris. Nous avons décidé d'utiliser ces modèles murins pour différentes raisons : d'une part ces modèles sont très bien établis, décrits et validés dans la littérature. D'autre part, il a été démontré

par différentes équipes de recherche que ces modèles récapitulent les étapes d'initiation et de progression des cancers pulmonaires humains. De plus, l'utilisation de ces modèles nous permettra de comparer nos résultats avec la littérature.

Durant l'étude de CD98hc dans l'initiation et la progression des cancers pulmonaires, la règle des 3R (Remplacer/ Réduire/ Raffiner) a été prise en compte comme suit :

- Remplacer : L'utilisation de lignées cellulaires humaines et murines, de lignées dérivées de patients, ainsi que la mise en culture de cellules cancéreuses murines seront utilisées dès que possible (par exemple pour un screening de drogues...). Quelques publications décrivent les cultures organotypiques comme une méthode de remplacement pour l'étude de l'initiation tumorale. Elles sont actuellement mises en place et seront envisagées aussi souvent que possible. Cependant, ces cultures sont encore très expérimentales et ne représentent pas toute la complexité tissulaire du poumon, c'est pourquoi nous avons besoin maintenant de valider nos résultats *in vivo* en ayant recours à des animaux.

- Réduire : La maîtrise de l'instillation intratrachéale permet de réduire le nombre de souris par groupe. En effet, la pénétrance du virus AdCre est optimale comparé à l'injection intranasale. De plus, elle permet une meilleure homogénéité de l'infection due à un contrôle du volume d'AdCre instillé dans les poumons. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été choisi afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le nombre de souris minimum. Nos groupes expérimentaux sont composés de 10 animaux en accord avec la pénétrance de la procédure et aucune distinction de sexe n'est nécessaire. Néanmoins, si après l'analyse de la première expérience nous constatons une différence entre les mâles et les femelles, nous utiliserons alors que l'un ou l'autre des sexes en fonctions des résultats obtenus.

- Raffiner : Ces expériences ont été pensées en tenant compte du bien-être animal. Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées dans le respect de la réglementation européenne en cours afin de respecter le bien-être animal et de réduire au minimum le niveau de stress des animaux. En particulier, chaque cage est dotée d'un double enrichissement (standard à l'animalerie): mouse house et carrés de coton. Enfin, les cages d'expérimentation sont séparées des élevages, permettant un suivi mieux adapté. Les animaux seront également suivis périodiquement à l'aide d'une fiche de score.

6133. L'épithélium respiratoire est constamment exposé aux agressions physiques, chimiques et environnementales. Suites aux altérations, il doit rapidement se réparer et restaurer ses fonctions. La régénération des tissus lésés est induite par des cellules souches et des cellules progénitrices. De récents travaux ont identifié plusieurs populations cellulaires capables de régénérer l'épithélium pulmonaire. Les cellules souches, quiescentes dans un poumon sain, prolifèrent en réponse à une blessure tissulaire. Une dérégulation continue du phénomène de réparation de l'épithélium avec une prolifération incontrôlée des cellules souches, contribue à la formation de fibroses. Une meilleure connaissance des mécanismes de régénération de l'épithélium respiratoire permettra une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la formation de fibroses et entrainera le développement de nouvelles cibles thérapeutiques. L'espérance de vie des patients atteints de fibroses pulmonaires est de 3 à 5 ans dû à l'inefficacité des traitements pharmacologiques actuels. Au cours de la fibrose, la dérégulation des cellules souches est notamment due à la réactivation des voies de signalisation impliquées durant le développement dont la voie de signalisation KRAS liée au développement des cellules alvéolaires. Ce projet a pour but d'étudier l'effet de la délétion de CD98hc dans la cicatrisation et la fibrose pulmonaire. Nos résultats montrent que CD98hc est très fortement exprimé dans la fibrose comparée au tissu pulmonaire sain chez l'humain et chez la souris. Etant donné le rôle de CD98hc dans l'homéostasie et la réparation de l'épiderme, nous souhaitons donc maintenant analyser le rôle de CD98hc dans la cicatrisation et la fibrose. Pour cela, nous utiliserons deux modèles de souris, 1) les souris CD98hc<sup>+/+</sup> dont les mécanismes de réparation et de régénération sont intacts et décrits dans la littérature et 2) les souris génétiquement modifiées présentant un délai de cicatrisation de l'épithélium cutané (modèle de KO conditionnel pour CD98hc). Ces souris seront utilisées dans deux types de procédures : 1) un modèle de blessure aiguë de l'épithélium respiratoire qui entraîne une réparation et une régénération tissulaire, 2) et une blessure chronique qui entraîne une dérégulation des mécanismes de réparation, l'apparition de cicatrices et de fibroses. Ces deux modèles de blessure sont basés sur l'utilisation d'un agent anticancéreux, la bléomycine. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir du nombre minimum d'animaux. Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins car les animaux transgéniques sont facilement disponibles et sont les plus couramment utilisés en laboratoire. Aussi souvent que possible, les expériences seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture. Cependant, la complexité du poumon, de par la présence de nombreux types cellulaires d'origine embryonnaire différente, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Les expériences ont été pensées en fonction de la règle des 3R (Remplacer/ Réduire/ Raffiner) :

- Remplacer : L'utilisation de lignées cellulaires humaines et murines, de lignées dérivées de patients seront utilisées dès que possible (par exemple pour un screen de drogues...). Quelques publications décrivent les cultures organotypiques comme une méthode de remplacement pour l'étude de la réparation tissulaire et de la fibrose. Elles sont actuellement mises en place et seront envisagées aussi souvent que possible. Cependant, ces cultures sont encore très expérimentales et ne récapitulent pas toute la complexité de l'organe, c'est pourquoi nous avons besoin maintenant de valider nos résultats *in vivo* en ayant recours à des animaux.

- Réduire : La maîtrise de l'instillation intratrachéale permet de réduire le nombre de souris par groupe. En effet, la pénétrance de la bléomycine est optimale par rapport à l'instillation intranasale. De plus, elle permet une meilleure homogénéité de l'infection due à un contrôle du volume de bléomycine instillé dans les poumons. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été choisi (statistique prédictive de Monte Carlo) afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec le nombre de souris minimum. Nos groupes expérimentaux sont composés de 10 animaux en accord avec la pénétrance de la procédure et aucune distinction de sexe n'est nécessaire. Néanmoins, si après l'analyse de la première expérience nous constatons une différence entre les mâles et les femelles, nous utiliserons alors que l'un ou l'autre des sexes en fonctions des résultats obtenus. Le nombre total d'animaux impliqués dans ce projet est 418.- Raffiner : Ces expériences ont été pensées en tenant compte du bien-être animal. Toutes les expériences et

manipulations des animaux seront effectuées dans le respect de la réglementation européenne en cours afin de respecter le bien-être animal et de réduire au minimum le niveau de stress des animaux. En particulier, chaque cage est dotée d'un double enrichissement (standard à l'animalerie) : mouse house et carrés de coton. Enfin, les cages d'expérimentation sont séparées des élevages, permettant un suivi mieux adapté. Les animaux seront également suivis périodiquement à l'aide d'une fiche de score.

Pour les différentes procédures proposées, les animaux seront anesthésiés avec un mélange Kétamine (100 mg/kg) + Xylazine (10 mg/kg). Pendant l'anesthésie et la phase de réveil, les souris seront exposées à un taux d'oxygène plus élevé (1,5L/min). En fin d'intervention, nous allons stopper l'anesthésie en injectant par voie sous cutanée 0,25mg/kg d'atipamezole.

6134. La consommation de viande est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques, rapportées dans le rapport de l'OMS (The Lancet Oncology, 2015) ont été consolidées par des études expérimentales du laboratoire à l'aide de modèles animaux et modèles cellulaires. Ces études chez le rat et sur des cellules coliques en culture ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer est le principal responsable de cette augmentation du risque. Cette facilitation de la carcinogenèse colorectale par le fer, est expliquée par une oxydation des lipides qui aboutit à la formation de composés toxiques pour les cellules coliques et pour l'ADN de ces cellules. Or dans une alimentation équilibrée, d'autres contaminants alimentaires comme certains pesticides, qui peuvent être toxiques pour les cellules coliques et leur ADN, peuvent atteindre le côlon. Ce projet vise à évaluer l'effet toxique au niveau du côlon (défense antioxydante, mort cellulaire et activité toxique pour l'ADN) d'une exposition alimentaire au fer héminique combiné ou non à un mélange de pesticides représentatif de l'exposition humaine. Ce projet sera centré sur le suivi de biomarqueurs de toxicité au niveau de la lumière colique lors d'une expérimentation nutritionnelle de 15 jours chez le rat avec des groupes expérimentaux de 5 rats par groupe (soit 25 rats au total pour 5 groupes expérimentaux, dans la cadre de la règle des trois R, le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante) sans intervention sur les rongeurs hors un gavage gastrique pour un groupe des 5 rats (procédure non invasive avec contacts visuels et olfactifs maintenus entre les animaux) hors la distribution quotidienne de l'alimentation, la récupération des fèces et urines à J0 et de J7 à J14 et l'injection d'un inducteur génotoxique pour les 5 rats du groupe « témoin positif ».

6135. Depuis 2003, le cancer est la principale cause de décès en France dont l'incidence ne cesse d'augmenter. La plupart des chimiothérapies anticancéreuses actuelles présentent une toxicité systémique importante limitant l'augmentation des doses administrées et donc les résultats thérapeutiques. Les nanomédicaments, qui incorporent des molécules médicamenteuses dans des véhicules de taille nanométrique (milliardième de mètre), représentent un espoir important pour le traitement de cette pathologie de par leur capacité à cibler des tissus ou des cellules malades.

Le projet global de l'équipe est de fabriquer de nouvelles formulations galéniques injectables de type nanoparticules contenant des molécules à visée thérapeutique dans le domaine du cancer.

Des systèmes nouveaux et originaux de transport de médicaments sont continuellement élaborés et développés au sein de notre laboratoire. Ceux qui auront passé une batterie de tests *in vitro* et démontré une activité cytotoxique prometteuse devront être testés dans un deuxième temps *in vivo* dans un modèle de cancer.

Celui choisi pour sa simplicité de mise en œuvre est celui de la greffe sous-cutanée de cellules tumorales. Le développement de nouveau médicament nécessite la mise en place d'expérience chez l'animal car la distribution du médicament et sa toxicité éventuelle doivent être analysés dans un organisme entier pour tenir compte des mécanismes de défense et de métabolisation qui seront mis en place par l'organisme et qui ne peuvent pas être reproduit *in vitro* du fait de l'implication de nombreux systèmes biologiques. Les modèles tumoraux chez l'animal permettent de reconstituer aussi la complexité de la tumeur, notamment la vascularisation, chose qui n'est pas encore possible *in vitro*.

Les nanoparticules dont nous souhaitons tester l'efficacité antitumorale seront composées de différents polymères synthétiques biodégradables couplés à des molécules anticancéreuses traditionnelles (gemcitabine, doxorubicine, paclitaxel, cisplatine). La supériorité thérapeutique des nanoparticules à base de vecteurs synthétiques par rapport à la molécule libre a déjà été démontrée mais ces vecteurs présentent souvent une toxicité élevée du fait de leur faible biodégradabilité. L'axe de recherche pour cette étude est de tester de nouveaux vecteurs dont les caractéristiques physico-chimiques ont été optimisées : augmentation de leur biodégradabilité et par conséquent diminution de leur toxicité, tout en perfectionnant le ciblage des cellules cancéreuses et la libération de la molécule anti-cancéreuse

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé *in vivo*. Nous prévoyons de tester 15 nanoparticules sur 5 ans.

L'efficacité thérapeutique sera testée sur un modèle de greffe sous-cutanée de cellules tumorale chez la souris. Le choix des cellules tumorales injectées sera fonction de la molécule anti-cancéreuse couplée au vecteur afin de respecter au maximum son indication thérapeutique. Nous avons à notre disposition différents types de cellules tumorales : cellules de cancer du sein humaines ou murines, cellules du cancer du pancréas humaines, cellules de mélanome murin.

Une planification statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude Le bien-être des animaux (raffinement) sera également pris en compte. Les animaux seront anesthésiés pour éliminer la sensation de douleur pendant toute intervention invasive. Afin de réduire la douleur à son minimum, de points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, seront déterminés.

L'état général des souris sera contrôlé tous les jours et des actions de lutte contre la douleur ou l'inconfort seront mis en place le cas échéant.

Pour la réalisation de ces expériences on estime utiliser 1170 souris sur les 5 ans.

6136. Due à une perte des neurones de la substance noire, impliqués dans le contrôle du mouvement, la maladie de Parkinson (PD) est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes qui touche rien qu'en France plus de 150 000 personnes de plus de 65 ans. Elle se caractérise essentiellement par des symptômes moteurs : lenteur du mouvement, tremblements de repos, rigidité musculaire et instabilité posturale. Aujourd'hui, le traitement est uniquement symptomatique, ce qui permet à la personne d'améliorer son quotidien. À ce jour, il n'existe aucun traitement pour la guérir. Les facteurs de risque peuvent être d'origines diverses (environnementaux, génétiques...) et ces mécanismes restent encore largement méconnus. On sait que la maladie de Parkinson est caractérisée par une accumulation anormale d'une protéine de conformation aberrante, l' $\alpha$ -synucléine, sous forme d'agrégats nommés corps de Lewy. Cette protéine a acquis un rôle central dans la clinicopathologie de la maladie de Parkinson et des autres synucléinopathies.

Depuis ces dernières années, de nombreuses preuves suggèrent que le dysfonctionnement des lysosomes à l'intérieur des neurones peut contribuer à la maladie de Parkinson. Les lysosomes sont des organites qui sont responsables de la dégradation de molécules, notamment l' $\alpha$ -synucléine, et de micro-organismes indésirables dans le cytoplasme. Lorsque leur fonction est perturbée, par exemple en raison de mutations dans des gènes codant pour des enzymes nécessaires à leur fonction, les déchets s'accumulent dans les cellules nerveuses, ce qui entraîne des lésions nerveuses et la mort de la cellule, à la suite de cette dysfonction.

Des stratégies qui visent à augmenter ou restaurer les fonctions du système lysosomal semblent donc des thérapies prometteuses. En adéquation avec cette hypothèse de travail, nous venons de mettre en évidence que l'utilisation de nanoparticules acidifiantes restaure les lysosomes dans des modèles génétiques et neurotoxiques de la maladie de Parkinson *in vitro* et *in vivo*. Ce travail a permis de démontrer, pour la première fois, que la seule restauration de la physiologie du lysosome, que l'on veut voir comme la réparation du système de nettoyage cellulaire, pourrait être d'intérêt thérapeutique pour les pathologies associées à des dysfonctions lysosomales, telles que la maladie de Parkinson.

Pour faire suite à ces données, ce projet a pour but de répondre à 2 questions. Premièrement, les nanoparticules ont-elles une action neuroprotectrice dans un modèle animal où l' $\alpha$ -synucléine agit comme le déclencheur de la pathologie. Deuxièmement, et en coordination avec des chimistes et galénistes experts, nous chercherons à améliorer la composition physique-chimique des nanoparticules afin de les rendre capable de passer la barrière hémato-encéphalique et entrer dans le cerveau, après injection par voie sanguine. De cette façon, nous pourrions cibler spécifiquement les cellules nerveuses et en particulier, les neurones dopaminergiques, qui sont touchés dans cette maladie. Nous testerons ces nanoparticules améliorées dans deux modèles murins relevant de la maladie de Parkinson, pour évaluer son efficacité neuroprotectrice.

Ce projet transversal et interdisciplinaire impliquant la maladie de Parkinson, mais également d'intérêt pour toute pathologie liée à une dysfonction lysosomale, permettra de démontrer que le lysosome est une cible thérapeutique valide, et que l'approche biotechnologique consistant à utiliser des nanoparticules fonctionnalisées pour atteindre le siège de la maladie est possible. Ce projet utilisera 180 souris. Pour vérifier les données obtenues avec des approches *in vitro*, et pour tester l'efficacité de l'administration de ces nanoparticules dans des modèles de maladie de Parkinson, nous ne pouvons pour l'heure nous passer d'utiliser des animaux vivants.

Dans le respect du R de réduire, nous avons dessiné la stratégie expérimentale de manière séquentielle afin d'éliminer dans chaque étape les molécules et voies d'administration infructueuses pour réduire le nombre d'animaux au minimum. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures sera apportée afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgésiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet.

6137. Avant de s'implanter dans un nouvel organe pour former des métastases, les cellules tumorales quittent la tumeur d'origine et circulent dans l'organisme : ce sont alors des cellules tumorales circulantes.

Dans le cas d'un cancer où des métastases ont été diagnostiquées, l'ablation chirurgicale seule n'est plus suffisante et un traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie s'impose. Le choix des thérapeutiques à ce stade de la maladie est très important. Aussi, les cellules circulantes étant à l'origine des métastases, peuvent aider aux choix de la thérapeutique efficace pour éviter l'installation des métastases et/ou ralentir la croissance de celles-ci. L'utilisation des xénogreffes établies à partir des cellules tumorales circulantes pourraient donc nous aider à trouver le médicament le plus efficace.

Notre objectif est de comparer des cellules tumorales circulantes avec les métastases provenant du même patient en utilisant les modèles de xénogreffes.

Dans un premier temps nous allons greffer en parallèle les xénogreffes à partir des cellules tumorales circulantes et les métastases du même patient. Cette étude est intéressante de plusieurs points de vue : d'abord, les xénogreffes obtenues à partir des cellules tumorales circulantes sont extrêmement rares et très difficiles à obtenir. Ensuite, aucune étude de comparaison entre les xénogreffes obtenues à partir des cellules tumorales circulantes et le tissu métastatique du même patient n'a été faite jusqu'à ce jour. Enfin, si notre étude montre la similitude des 2 xénogreffes, alors nous pouvons établir des xénogreffes à partir des cellules tumorales circulantes des patients dont les métastases sont inaccessibles et trouver le meilleur traitement pour ceux-ci. L'objectif à terme est de choisir des médicaments ou des combinaisons de médicaments qui empêcheraient l'évolution métastatique de la maladie à l'aide de ces modèles précliniques

Les greffes sur les souris sont faites sous anesthésie générale. Des mesures régulières permettent l'évaluation de la croissance tumorale. Le nombre de souris est au maximum de 960 souris sur 3 ans. Ce nombre est réduit à son strict minimum nécessaire et tient compte du taux de prise tumoral (50%) sur les animaux. Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

6138. A l'état naturel certains rats portent des mutations qui les rendent résistants aux rodenticides anti-vitamines K. En contrepartie ces rats ont des besoins augmentés en vitamines K dans leur alimentation pour permettre le maintien de la coagulation mais aussi l'équilibre ostéo-calcique des tissus mous et du réseau artériel.

Les rôles des vitamines K dans ce maintien ne sont cependant pas bien déterminés ni chez l'Homme, ni chez l'animal. Il est d'autant plus difficile d'étudier et de comprendre ce phénomène qu'il n'existe à ce jour aucun modèle animal de carence en vitamines K qui soit simple à mettre en place et non accompagné d'une altération importante de la coagulation. Il n'est pas possible d'étudier les phénomènes complexes de la coagulation et de la calcification vasculaire *in vitro*. Un modèle animal est indispensable et nous avons identifié des souches de rats naturellement mutants, dont le métabolisme de la vitamine K est altéré. Ces mutations ont été transmises sur 10 générations avec des rats de type Sprague-Dawley. Ces souches pourraient donc être des modèles de choix pour la compréhension des phénomènes induits par une carence en vitamines K comme les calcifications vasculaires. L'objectif de ce projet sera donc de caractériser les effets d'une carence en vitamines K dans le régime alimentaire chez ces rats, qui va donc s'ajouter à leur déficience naturelle. Pour cela l'effet du sexe, de l'âge, du type de souche et du temps de carence sera évalué en fonction de différents régimes alimentaires. L'effet potentiellement bénéfique d'une supplémentation en vitamines K sera aussi évalué. Ce projet d'une durée de 5 ans prévoit l'utilisation d'un maximum de 900 rats. Ce chiffre, le nombre minimum nécessaire pour obtenir des résultats interprétables, pourra cependant être revu à la baisse en fonction des résultats obtenus au cours du projet. Les animaux sont, en règle générale, nourris et élevés avec un régime riche en vitamine K et ils ne souffrent pas de leur anomalie métabolique. Au cours des expériences, des lésions pourraient apparaître, en particulier au niveau cardiaque. Nous serons très attentifs à leur évolution et ferons en sorte de limiter les souffrances induites par ces pathologies. Les animaux seront maintenus en groupes harmonieux avec des moyens de se cacher la journée, comme le font les rats en milieu naturel, et de s'ébattre la nuit.

6139. L'arthrose ou ostéoarthrite est une affection chronique qui se manifeste par des douleurs persistantes aux articulations causées par l'usure anormale du cartilage et de l'ensemble de l'articulation. Un des traitements de l'arthrose consiste en l'injection intra-articulaire de gel de visco-supplémentation qui permet une lubrification articulaire. Les travaux sur les gels de visco-supplémentation sont toujours en cours afin de trouver des gels plus efficaces, dont la résorption est plus lente et qui puisse interagir positivement, à long terme, avec l'environnement articulaire.

Le modèle de la poche d'air chez la souris est largement utilisé pour étudier les effets des biomatériaux de visco-supplémentation. En effet, ce modèle permet d'investiguer la biocompatibilité, l'immunogénicité des biomatériaux en analysant la réponse inflammatoire induite au niveau de la poche. L'objectif à terme est de sélectionner des gels biocompatibles c'est-à-dire n'induisant ni inflammation ni immunogénicité et ayant un temps de résorption plus long que les gels actuels.

Chaque groupe expérimental du plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. En effet, la réponse inflammatoire *in vivo* implique des interactions multiples et complexes. Bien qu'il soit possible de disséquer les événements inflammatoires individuels en détail avec des études *in vitro*, toutes les interactions impliquées dans la réponse inflammatoire *in vivo* ne sont pas possibles à simuler *in vitro*. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), la création de la poche d'air s'effectue sous anesthésie gazeuse avec une couverture analgésique appropriée, afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus, nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permette de réduire le nombre d'animaux utilisé.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 640 souris est envisagée.

6140. Le sarcome épithéloïde est une tumeur maligne de l'adolescent et du jeune adulte avec un très mauvais pronostic, notamment en présence de métastases. Aucune amélioration thérapeutique significative n'a été proposée durant la dernière décennie. Les sarcomes épithéloïdes appartiennent à un groupe de tumeurs caractérisées par l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur spécifique. Ce gène interagirait probablement avec des voies de signalisation oncogénique. Ceci nous conduit à envisager de possibles stratégies d'inhibition de cette cible en utilisant des molécules spécifiques, capables de bloquer les enzymes de type histone déacétylase.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de différents médicaments inhibant ces enzymes, *in vitro*, dans deux lignées cellulaires de sarcome épithéloïdes et une lignée de tumeur rhabdoïde présentant des caractéristiques similaires. Sur l'ensemble des molécules évaluées, une molécule a montré un effet remarquable sur la prolifération cellulaire, associé à une forte mort cellulaire et à une réactivation du gène suppresseur de tumeur caractéristique. Ces résultats nous invitent fortement à évaluer l'activité de cette molécule dans des modèles *in vivo* de sarcomes épithéloïdes afin de confirmer l'intérêt de son utilisation en clinique.

Dans cette étude, nous utiliserons 240 souris. Pour limiter le nombre d'animaux utilisé, nous explorerons l'activité antitumorale de cette molécule dans deux xéno greffes dérivées de lignées, préalablement testées *in vitro*, et le nombre d'animaux sera limité à 10 animaux porteurs de 2 greffons, par groupe pour obtenir un résultat significativement analysable et tous les groupes seront comparés entre eux (par modèle expérimental) à l'aide d'une analyse statistique. Pour explorer l'effet de la molécule sur la biologie des cellules tumorales, 3 animaux porteurs d'une tumeur chacun/lot seront étudiés à différents temps de traitement. 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 l'environnement sera enrichi avec du cocoon. Chaque étape devra être validée et significative pour passer à la suivante. Un échec lors d'une étape entrainera l'arrêt du protocole.

6141. Malgré l'arrivée de nouvelles thérapies, le cancer reste une maladie dans la plupart des cas incurable, parce que les tumeurs ont, ou acquièrent, une agressivité qui conduit le patient vers un sombre pronostic. Notre projet est fondé sur l'identification de facteurs qui favorisent la progression tumorale. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à la Neurotensine (NTS) et son récepteur de haute affinité (NTSR1).

Notre objectif est de développer des approches précliniques utilisant des xénogreffes de tumeurs dérivant de patient (PDX) afin de démontrer la contribution de ce complexe NTS/NTSR1 dans la croissance tumorale et dans le processus métastatique. Nous allons tester des molécules thérapeutiques ciblant le complexe NTS/NTSR1 et évaluer leur efficacité sur la progression tumorale et la réponse aux agents antitumoraux utilisés couramment dans les protocoles cliniques. L'objectif à terme étant de déterminer des combinaisons thérapeutiques permettant de diminuer la progression tumorale chez l'homme.

Dans notre laboratoire, nous avons développé des modèles de xénogreffes de cancer de poumon, de l'ovaire et de colon obtenues à partir de greffe de tumeurs humaines sur des souris adultes immunodéficientes afin de limiter le rejet des tissus humains. Ces modèles permettent d'évaluer l'efficacité antitumorale des nouvelles molécules seules ou associées à la chimiothérapie.

Ce projet devrait utiliser au maximum 2160 souris sur 5 ans. Ce nombre est réduit à son strict minimum nécessaire tenant compte du taux de prise tumorale (65 à 67%) sur les animaux et l'évaluation de façon statistique robuste de l'effet des médicaments.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur bien-être. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

6142. Ce travail s'inscrit dans une étude plus large, débutée il y a plus de 10 ans et concernant l'utilisation de l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) et de la SRM-2D-1H (Spectroscopie par Résonance Magnétique 2D-proton), méthodes a-traumatiques et non-invasives, pour observer l'efficacité de traitements contre la myopathie de Duchenne sur du muscle, les dits traitements étant testés sur des souris mdx (modèle de myopathie de Duchenne). Lors de ces suivis, il s'est parfois avéré difficile de faire la distinction entre des muscles en phase de réparation et ceux qui étaient en phase d'endommagement et du coup de trancher pour ou contre l'efficacité du traitement testé, et ce, aussi bien en IRM qu'en SRM-2D-1H. Avec les moyens techniques à disposition à l'époque (enregistrement des signaux SRM non localisés), il n'était pas possible d'attribuer précisément les signaux métaboliques observés sur la patte de souris, ces derniers pouvant venir de zones où le muscle était sain ou en cours de dégénérescence/régénération. Depuis lors, nous avons développé des conditions IRM et SRM-2D-1H qui permettent de réaliser des mesures SRM 2D-1H très précises (distinction des muscles sains et de ceux injectés dans la patte). Après les mises au point IRM/SRM-2D-1H sur des échantillons tests, puis sur des cellules musculaires de souris dans différents états, et avant d'utiliser cette méthode sur des souris mdx en cours de traitement ou non, il nous faut travailler sur un modèle de dégénérescence/régénération musculaire synchrone. D'où le travail sur un modèle de régénération musculaire sur souris dans la présente étude. La méthode étant non traumatisante pour les animaux, seules 24 souris seront nécessaires à la caractérisation IRM/SRM des 21 jours de la régénération. Chacun d'eux sera observé 8 fois, 48h de repos étant observé entre deux examens. La collecte de 10 mesures pour chacun des 11 points d'intérêt permettra de faire une analyse statistique des résultats de l'étude.

6143. La vaccination est l'une des avancées majeures de la médecine moderne. Elle a permis de réduire grandement la prévalence de nombreuses maladies telles que la variole et le maintien d'une bonne couverture vaccinale est indispensable pour éviter la résurgence de ces maladies infectieuses.

Bien que l'utilité de la vaccination ait été amplement démontrée, une défiance croissante de la population vis-à-vis de la vaccination a émergé depuis quelques années, liée à certains événements, comme par exemple les crises sanitaires (Médiator, sang contaminé, etc.), les soupçons de collusion entre autorités de santé et industrie du médicament sous l'effet de scandales médiatisés et la question des adjuvants dans les vaccins.

L'oxyhydroxide d'aluminium (alum) est utilisé pour ses propriétés d'adjuvant vaccinal depuis 1927. Il demeure l'adjuvant le plus utilisé, mais les mécanismes par lesquels il stimule la réponse immunitaire sont encore largement incompris. Généralement bien toléré, l'alum pourrait cependant être à l'origine de troubles chroniques occasionnels chez des sujets prédisposés. En effet, de rares sujets vaccinés présentent des myalgies retardées et diffuses, un état d'épuisement chronique et des troubles cognitifs invalidants. Ces symptômes, associés à la présence d'un granulome chargé en particules d'aluminium au niveau du site d'une immunisation préalable avec un vaccin adjuvanté en hydroxyde d'aluminium, permettent de diagnostiquer une condition pathologique décrite au laboratoire comme la Myofasciite à Macrophages (MFM).

Des études antérieures réalisées chez la souris indiquent que l'adjuvant injecté dans le muscle est en partie transporté à distance par des cellules de la lignée monocyttaire, d'abord vers les ganglions lymphatiques de drainage puis, via le canal thoracique, vers la circulation sanguine, avec une accumulation retardée et progressive dans le cerveau. Quoique constante, la pénétration cérébrale reste extrêmement faible en conditions normales, ce qui est cohérent avec la bonne tolérance générale à cet adjuvant malgré son fort potentiel neurotoxique.

Chez les patients MFM, des mutations génétiques ponctuelles touchant un mécanisme de détoxification cellulaire (l'autophagie) qui entre en jeu dans l'élimination de l'alum suite à une vaccination ont été mises en avant.

Le présent projet repose sur l'hypothèse qu'un défaut dans le mécanisme autophagique permettrait un transport plus important de l'alum vaccinal jusqu'au cerveau, où il induirait un effet neurotoxique conduisant aux troubles observés chez les patients MFM. Notre but est de comprendre l'implication de l'autophagie dans les mécanismes de transport de l'alum vaccinal depuis le muscle

injecté jusqu'au cerveau et l'effet de l'accumulation cérébrale de l'alum par une étude comportementale des animaux, afin de mettre en avant d'éventuels troubles cognitifs communs avec les patients MFM sur 120 souris C57BL/6J mâles de 2 mois.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. L'étude de la distribution systématique d'un agent pharmacologique ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers et ne peut donc être substitué par une étude *in vitro*. La souche de souris C57BL/6J a été sélectionnée pour sa consanguinité réduisant la variabilité interindividuelle. L'utilisation de mâles sera préférée pour la même raison de baisse de la variabilité par l'absence d'impact du cycle des hormones sexuelles sur le comportement. Le nombre d'injections sera réduit au minimum pour le bien-être des animaux et des points limites ont été intégrés au protocole pour limiter le stress et la souffrance des animaux. La vaccination des souris ne génère a priori pas d'effets dommageables évidents, ceux-ci pouvant être comparés à ceux occasionnés chez l'homme, à savoir un éventuel état fébrile temporaire. Le milieu sera enrichi par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Notre protocole expérimental ne comprend pas de procédure *a priori* douloureuse mais les animaux seront suivis quotidiennement afin de suivre leur bien-être.

6144. L'infection au parasite unicellulaire *Toxoplasma gondii*, à l'origine de la toxoplasmose, est la première cause infectieuse d'inflammation rétinienne chez l'Homme. Le parasite persiste pendant toute la vie de son hôte dans des organes spécifiques comme muscle, cerveau ou l'œil. La présence des kystes toxoplasmiques dans l'œil, contenant des formes dormantes du parasite, constitue un risque de réactivation et donc d'une diminution de la vision, et ceci à vie. Or, les mécanismes physiopathologiques de cette maladie sont mal connus. Ceci est avant tout dû à la difficulté d'accès aux yeux humains. Ces contraintes rendent difficile de trouver un consensus sur le traitement. Notre recherche vise à trouver des cibles spécifiques pour l'intervention médicale.

Pour des raisons évidentes, le modèle humain ne peut pas être étudié en grand détail, même si nous avons réussi à tirer des conclusions importantes de l'analyse de cytokines dans l'humeur aqueuse des patients. Pour remplacer des expériences chez l'animal, nous avons établis des modèles *in vitro* pour des questions à l'échelle cellulaire. A cause de la grande complexité du système oculaire, les expérimentations animales restent nécessaires pour étudier les mécanismes physiopathologiques. Lors de travaux précédents, nous avons établi un modèle murin adapté à l'étude de l'impact de la toxoplasmose sur la rétine permettant aux souris infectées de survivre sans développer de signes sévères de maladie, mais des lésions détectables de la rétine.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes liés à la réactivation locale du parasite lors d'une infection chronique à différentes échelles en couvrant différents aspects physiopathologique de la toxoplasmose oculaire: anatomiques, fonctionnels, physiologiques, immunologiques... Ceci devrait permettre de modéliser les réactivations de la toxoplasmose oculaire chez l'Homme, la complication la plus redoutée car elle est cécitante par destruction de la rétine. Pour cela, nous avons établi un modèle murin et l'avons développé dans les années précédentes. Le projet ici reprend ce modèle pour continuer d'étudier les questions du projet précédent et de répondre à des nouvelles questions scientifiques. Pour toutes ces expériences, les souris sont infectées par gavage, modélisant une infection naturelle. Après 4 semaines, les souris sont réinfectées localement, par injection intra vitrée de parasites, modélisant une réactivation rétinienne. En utilisant cette technique, nous augmentons considérablement le taux de rétines infectées et pouvons donc réduire le nombre de souris utilisées. Après l'euthanasie, nous étudions différentes variables. Premièrement, nous comparons des souches de souris résistantes et sensibles. Parce que nos études précédentes ont montré un rôle important de la réaction inflammatoire, nous étudions le développement de cette inflammation dans le cadre des collaborations avec des techniques sophistiquées, comme des fonds d'œil chez le petit rongeur et l'immunomarquage de plusieurs marqueurs simultanément. Puis, nous procédons à la neutralisation de médiateurs (cytokines) centraux de cette réaction, ou, à l'inverse, une stimulation avec certaines cytokines. Puis, l'effet de cette neutralisation ou stimulation sur la réplication parasitaire et la pathologie est évalué. Finalement, nous utilisons également des souches de *Toxoplasma* de virulence différentes. Cette étude est une première étape pour le développement des interventions cliniques ciblées.

5200 souris au maximum seront utilisées dans ce projet, réparties selon différentes conditions expérimentales :

- Sensibilité à la toxoplasmose en fonction de la souche de souris
- Modulation de la réaction immunitaire
- Rôle des médiateurs clés de l'inflammation
- Rôle d'un facteur génétique du parasite déterminant sa virulence

Parmi ces animaux, un groupe (n=170) sera dédié à la maintenance du parasite sous forme kystique qui ne peut pas se faire dans des conditions *in vitro*.

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

- Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif du travail est de visualiser les zones de ciblage et localisation cérébrales de peptides utilisés dans le traitement de cette pathologie. Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann et Whitney, adéquat pour les petits effectifs.

- Réduire: L'utilisation de techniques non invasives comme fonds d'œil, nous permet de suivre le cours d'infection chez une souris et donc de réduire le nombre de souris utilisées. L'immuno-marquage simultané de plusieurs marqueurs nous permet aussi de réduire significativement le nombre de souris. Pour ce projet, le nombre de souris utilisées a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des conclusions statistiquement significatives.

- Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux. Lors de nos précédentes études sur ce modèle, nous avons affiné les manipulations nécessaires pour garantir le bien-être des animaux dans la mesure du possible. Les animaux sont manipulés par des personnes formées et compétentes de façon de réduire le stress induit par la manipulation.

6145. Les sarcomes des tissus mous représentent un groupe hétérogène de tumeurs (50 histotypes différents) affectant chaque année 4500 adultes et enfants, le décès survient dans près de 50% des cas parce qu'il y a très peu de traitement à la disposition des médecins.

En effet, à l'heure actuelle de nombreuses thérapies ciblées sont développées et testées chez des patients atteints de cancer (colon, sein, poumon...) mais peu d'essais sont réalisés chez des patients atteints de sarcome à cause de la rareté des modèles précliniques (cellules *in vitro* et modèles de souris). Le développement de modèles précliniques pour l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques représente donc un enjeu crucial.

Notre équipe est localisée dans un institut qui est centre de référence dans le traitement de ce cancer rare et nous avons donc la possibilité d'obtenir des tumeurs de patients et ainsi de pouvoir développer des lignées cellulaires et des modèles de souris xénotreffées avec ces tumeurs. Celles-ci vont nous permettre de tester des médicaments et combinaisons de médicaments pour lesquels nous avons des données bibliographiques dans d'autres types de cancer. Les tests seront d'abord réalisés sur des cellules en culture et dans la mesure où ils sont concluants, ils seront réalisés sur des souris sur lesquelles on aura implanté une tumeur de patient (modèle PDX). Nous allons nous focaliser sur les 3 histotypes les plus représentés : liposarcomes différenciés (LPS), leiomyosarcome (LMS) et sarcomes pléomorphes indifférenciés (UPS) et nous souhaiterions inclure 5 patients pour chacun des histotypes.

Des données préliminaires obtenues dans notre laboratoire nous conduisent à nous intéresser à des thérapies qui agissent sur des cibles spécifiques (thérapies ciblées) seules ou en combinaison avec une chimiothérapie standard (la gemcitabine).

Ces expérimentations *in vivo* s'inscrivent dans un projet de recherche translationnelle qui vise à élargir l'éventail thérapeutique dans le traitement des sarcomes des tissus mous, elles sont essentielles avant de pouvoir réaliser les essais chez l'homme. Toutes les expérimentations sont réalisées par du personnel qualifié, le nombre de souris est limité au maximum, le but étant d'obtenir des données significatives d'efficacité du médicament. Les animaux sont surveillés par le personnel de l'animalerie quotidiennement et sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée enrichi par des tunnels en polycarbonate ou polysulfone.

Ce projet nécessitera l'implantation de 1755 animaux sur 3 ans.

6146. Pour la grande majorité des espèces animales, la communication sociale est déterminante pour les comportements agonistiques, reproducteurs et alimentaires. Elle est basée sur la reconnaissance d'attributs distinctifs d'une espèce qui prennent des aspects plus ou moins complexes. Ces attributs peuvent être visuels, depuis les simples taches rouges chez l'oiseau (susitant l'agressivité chez le rouge-gorge et le nourrissage chez le goéland) jusqu'aux livrées nuptiales (nombre d'espèces à dimorphisme sexuel prononcé) ou aux expressions faciales complexes des primates. Ils peuvent être auditifs, depuis les cris d'alarmes jusqu'à la production de vocalisations, de chants complexes et du langage. Les interactions sociales nécessitent la combinaison visuo-auditive de ces attributs lors de comportements complexes comme la parade nuptiale chez l'oiseau, la signalisation de l'arrivée d'un prédateur chez le singe ou la compréhension du langage parlé chez l'homme.

Dans un environnement où constamment des bruits créent des interférences, l'intelligibilité de la parole nécessite une intégration précise des informations issues des modalités visuelles et auditives. Une bonne connaissance de ces interactions visuo-auditives en conditions normales est nécessaire pour comprendre les mécanismes conduisant à la récupération fonctionnelle chez les patients sourds implantés.

Il a été récemment montré que le singe macaque rhesus peut être un modèle pour étudier les mécanismes neuronaux des intégrations visuo-auditives dans un contexte de communication sociale. En effet, chez le singe, des rudiments de syntaxe peuvent être utilisés en situation de communiquer, par exemple, la présence et l'identification d'un danger. La production de vocalisations s'accompagne également d'expressions faciales spécifiques, tout comme chez l'homme engagé dans une conversation.

Nous comptons utiliser l'inactivation corticale réversible par le froid et l'enregistrement par microélectrodes de régions du cerveau pour déterminer leur rôle dans l'intégration des vocalisations conspécifiques au travers d'une tâche comportementale faisant intervenir des stimuli complexes (images naturelles d'animaux, sons de vocalisations) intervenant dans la communication.

Application de la règle des 3 R au projet :

Nous utiliserons 4 macaques rhesus pour cette étude, 2 pour chaque grande partie car un animal ne peut être utilisé dans chacune d'elle pour des raisons techniques. Cet effectif est dans la norme de la plupart des études chez le singe macaque en neuroscience par la nécessité de reproduire les résultats (de chaque partie) chez un second sujet.

Le nombre d'animaux est également réduit car l'utilisation d'une méthode d'inactivation réversible du cerveau fait que l'animal est son propre contrôle. L'application du froid en elle-même est indolore.

Nous ne pouvons toutefois pas remplacer le modèle animal puisque le dispositif d'inactivation réversible et l'enregistrement électrophysiologique ne peut pas être employé chez l'humain.

Notre protocole nécessite des interventions chirurgicales qui sont effectuées sous anesthésie générale (2 par animal) dans notre bloc opératoire. Le traitement de la douleur et antibiotique per et post opératoire est assuré en collaboration avec notre vétérinaire référent.

6147. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un



large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 100 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 105 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

6148. Le prurit, défini comme une sensation déplaisante qui provoque le besoin de se gratter, est un symptôme présent dans de nombreuses affections de la peau, comme les maladies cutanées (essentiellement inflammatoires), l'accumulation de toxines (urémie), ou maladies générales (maladies endocriniennes). Il se présente sous forme aiguë ou chronique. Le présent projet vise à développer et utiliser des modèles de prurit induit chez les rongeurs dans le but d'étudier les différents mécanismes impliqués pour ensuite évaluer l'activité de candidats médicaments dans cette indication.

La procédure expérimentale décrite dans ce projet consiste à développer et utiliser des modèles expérimentaux de façon à activer différents mécanismes à l'origine du prurit pour ensuite tester l'efficacité de nouvelles molécules en les comparant à des produits de référence. Les critères d'évaluation relevés sont d'ordre clinique (quantification du grattage...), physiopathologiques (pertes en eau au niveau cutané...), biologiques (marqueurs de l'inflammation) ou histologiques (modifications structurelles de la peau). Les candidats médicaments testés sont appliqués le plus souvent par voie locale, directement sur les lésions cutanées. Ils peuvent également être administrés par voie orale ou parentérale (sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, ...) en fonction de leur mode d'action et de leurs propriétés pharmacocinétiques.

Le bénéfice attendu de ce projet est très important car il permet de démontrer au travers d'un modèle expérimental, l'activité de futurs médicaments dans le traitement du prurit. Ainsi, seules les molécules les plus efficaces poursuivent les étapes de développement. Les procédures expérimentales mises en œuvre interviennent après une sélection des molécules d'intérêt sur des modèles *in vitro*, par exemple selon leur affinité et leur sélectivité pour la cible pharmacologique.

Remplacer ce modèle expérimental par des tests *in vitro* n'est pas possible car l'ensemble des interactions anatomiques et fonctionnelles d'un organisme vivant sont nécessaires pour évaluer l'efficacité d'une molécule active sur la démangeaison et le grattage. La réduction du nombre d'animaux nécessaires s'opère au travers :

- des critères d'évaluation quantitatifs et pertinents qui permettent d'objectiver plus facilement des différences significatives sur un nombre limité de sujets,

- de l'utilisation de ces modèles seulement pour les molécules les plus prometteuses, sélectionnées au préalable à partir de tests *in vitro*.

Le raffinement des procédures expérimentales se traduit par une anesthésie des animaux lors de l'administration de l'agent d'induction, la mise à disposition d'enrichissements dans les cages (exemple : igloo, matériel de nidification, bâtonnet à ronger) et une surveillance clinique particulière pendant toute la durée de l'étude.

Un effectif maximal de 2500 souris et 2500 rats sur 5 ans est nécessaire pour la conduite de ce projet.

6149. Les calcifications vasculaires et valvulaires se développent progressivement et de manière très variables avec l'âge, et représentent un risque cardiovasculaire indépendant.

Aucun traitement spécifique n'existe à ce jour. Le but de ce projet est de préciser les mécanismes communs et propres à chacune des localisations. La calcification des artères et des valves cardiaques est déclenchée par l'inflammation et entraîne une augmentation de la rigidité artérielle et un rétrécissement aortique, qui seront également explorés.

Plus spécifiquement, nous allons étudier les médiateurs lipidiques dérivés des acides gras polyinsaturés, qui induisent la résolution de l'inflammation par leurs effets protecteurs sur la calcification cardiovasculaire. Le rôle des voies de la coagulation dans la calcification cardiovasculaire sera également exploré.

Les objectifs de ce projet sont (1) de modéliser chez le rongeur les calcifications vasculaires et valvulaires avec l'inflammation associée. (2) d'analyser l'induction de médiateurs lipidiques responsable de la résolution de l'inflammation chez l'animal contrôle en conditions normales vs après induction des calcifications. (3) d'observer le développement des calcifications chez l'animal invalidé pour un récepteur des médiateurs lipidiques dans des conditions avec ou sans supplémentation en médiateurs et de comparer avec l'animal contrôle malade.

Ainsi nous compléterons les connaissances sur les mécanismes de résolution de l'inflammation par les médiateurs lipidiques dans les maladies cardiovasculaires et nous proposerons un potentiel traitement à base d'une supplémentation de ces médiateurs.

L'idée d'induire une résolution de l'inflammation par les médiateurs lipidiques et non une inhibition totale de l'inflammation telle qu'elle est développée dans les recherches cliniques actuelles représente un avantage certain vis-à-vis des effets secondaires d'un traitement anti-inflammatoire. Malheureusement, afin de pouvoir étudier les mécanismes responsables de la calcification artérielle et valvulaire nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle animal. En effet, le processus de calcification cardiovasculaire met en jeu de multiples cellules des vaisseaux sanguins telles que les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales mais aussi l'ensemble des partenaires cellulaires qui compose le système immunitaire et inflammatoire.

Chaque type cellulaire possédant des conditions de cultures qui leur sont propres, leur étude *in vitro* doit se réaliser de façon isolée, perdant ainsi toutes les interactions entre les différents types cellulaires présents dans les conditions physiologiques.

Pour cela, l'expérimentation animale est nécessaire. Néanmoins nous respecterons la règle des 3R et il est prévu un effectif calculé au plus juste pour mettre en évidence des différences au plan statistique d'environ 50 rats et 820 souris pour les 3 ans. Les animaux mâles et femelles sont utilisés pour la reproduction et les animaux mâles pour l'étude des phénotypes. Dans un souci de réduction des animaux, les souris contrôles utilisées seront issues des croisements réalisés dont les génotypes ne sont pas ceux invalidés pour les gènes d'intérêts. De même, nous utiliserons tout animal provenant d'autres croisements de l'unité dont le génotype nous permet l'utilisation dans nos protocoles (mis en commun des animaux).

Dès lors que l'on étudiera des aspects intrinsèques à chaque type cellulaire, nous travaillerons sur des cultures de cellules issues de lignées immortalisées afin de remplacer l'animal (remplacement).

Pour l'aspect des points limites, les animaux seront anesthésiés pour toute procédure ne nécessitant pas un animal vigile. Lorsque les paramètres décrits au point 3.4.13 varieront, l'animal recevra un antalgique (buprénorphine) ou bien sera mis à mort afin d'éviter toute douleur. Ces paramètres comprennent la surveillance de la perte de poids, des modifications de la respiration, de la posture, et de la température qui sera contrôlée si l'on suspecte une possible variation.

Chacun des aspects sera surveillé de façon hebdomadaire.

De plus, pour les animaux recevant une alimentation sous forme de poudre, un soin particulier et quotidien sera apporté pour la détection de toute inflammation puis pour permettre aux animaux d'user leurs dents, des morceaux de bois spécifiques seront ajoutés à leurs conditions d'hébergement (raffinement). Dans le cadre où les dents seraient trop longues celles-ci seront limées.

Un traitement ayant pour visée de réduire le développement des calcifications cardiovasculaires sera administré dans certains groupes de souris *via* une injection dans l'abdomen. La pression artérielle des souris sera prise à la queue toutes les 2 semaines. Cette technique est non invasive, indolore et les souris seront préalablement acclimatées à la procédure afin de limiter tout stress.

Les animaux *in fine* seront soumis à une échographie cardiovasculaire sous anesthésie générale à l'isoflurane. Ils seront ensuite mis à mort toujours sous anesthésie et différents organes seront prélevés *post mortem* pour expérimentation.

6150. Pour évaluer la sécurité des produits chimiques sur la santé humaine, différentes études sont nécessaires. Ces études combinent des modélisations mathématiques par ordinateurs (études *in silico*), des modèles cellulaires (tests *in vitro*) et des modèles animaux (études *in vivo*). L'objectif est de ne soumettre à autorisation que des produits dont le profil toxicologique garantit l'absence d'effet néfaste sur la santé humaine.

Ce projet concerne l'ensemble des premières études toxicologiques réalisées chez l'animal. A ce stade de développement d'un produit chimique, les informations sur la caractérisation du profil toxicologique sont parcellaires, et souvent inexistantes dans un organisme entier.

En accord avec le principe des 3R, le recours à l'animal doit être réduit au maximum. Les études *in vivo* sont cependant incontournables pour appréhender les effets d'un produit chimique sur un organisme entier. Dans le cas des études *in vivo*, la priorité

est de garantir le bien-être des animaux en n'administrant les produits qu'à des doses appropriées. Pour ce faire et pour que les études exploratoires et de choix de doses soient les plus prédictives possibles, elles sont réalisées sur les mêmes espèces que les études constitutives du dossier de mise sur le marché des produits (rongeurs : rats et souris).

On distingue trois types d'essais précoces :

- D'abord, les études exploratoires de criblage ou de sélection (souvent appelées « screening »). Elles interviennent assez tôt dans le processus de développement des produits. Ce sont des études courtes de quelques jours seulement et presque toujours de moins de 28 jours, avec un nombre restreint d'animaux. Elles permettent de déterminer des effets toxiques au niveau moléculaire ou morphologiques, d'identifier les organes cibles, d'approfondir les connaissances sur la famille de produit (mode d'action). Elles servent à sélectionner les matières actives susceptibles de poursuivre le processus de développement.

- Ensuite, les études de choix de doses qui sont réalisées sur des matières actives sélectionnées précédemment. Elles permettent de définir les doses qui n'induisent pas d'effets délétères chez l'animal.

- Enfin, la 3ème procédure dans ce projet concerne des études de choix de doses pour les études sur le développement du fœtus. Ces types d'études permettent de sélectionner les procédures les plus pertinentes pour limiter le nombre d'animaux et pour raffiner la conception des études. Toutes ces études se font dans le respect des 3R avec un nombre restreint d'animaux (en général moins de 5 par groupe). Par an, un total de 1000 rats et 200 souris seront utilisés pour l'évaluation d'une centaine de molécules différentes, pour un total de 6000 rongeurs sur 5 années pour ce projet. Les animaux sont hébergés avec un enrichissement du milieu adapté à leur bien-être, à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (week-ends compris). Toutes les informations concernant les animaux sont enregistrées dans un logiciel. Des points limites ont été définis par le laboratoire, ils conditionnent l'appel à un vétérinaire du site pour un traitement ou l'arrêt de la procédure. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée conjointement par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

6151. D'après l'OMS, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. On comptait effectivement en 2012, 8.2 millions de décès liés à la maladie. Les lymphomes et les leucémies représentent plus de 500 000 cas chaque année dans le monde. Les lymphomes et leucémie sont des cancers dits liquides ou sanguins car ils touchent le sang et la moelle osseuse pour les lymphomes et le système lymphatique (lymphocytes) pour les lymphomes.

A ce jour, il existe plusieurs types de traitements contre les cancers reposant le plus souvent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la radiothérapie. Cependant, ces traitements ne permettent pas une rémission des cancers dans 100% des cas. Il est donc important de développer de nouvelles générations de traitements anti-cancéreux.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements anti-tumoraux innovants.

Dans un premier temps, la croissance de différentes lignées de cellules tumorales solides ou liquides sera caractérisée afin de tester dans un second temps l'efficacité de différents produits anti-tumoraux sur ces différentes lignées cellulaires tumorales.

Afin de répondre à l'objectif 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 la progression d'une tumeur dans un corps entier. En outre, la culture cellulaire ne permet pas de modéliser les différentes interactions cellulaires entre les cellules tumorales, leur *stroma* et les cellules immunitaires de l'hôte.

De ce fait, l'efficacité de ces nouveaux traitements anti-tumoraux sera testée sur un modèle murin immunodéprimé à la fois pour permettre une pousse tumorale et également pour empêcher toute réaction de rejet potentiel du traitement administré. Les cellules cancéreuses pourront être suivies par imagerie de bioluminescence au cours du temps permettant la quantification de la pousse tumorale.

Cette méthode apporte plusieurs avantages. C'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. Elle permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés tout au long de l'étude. D'un point de vue éthique, cette technique permettra également de visualiser le développement des cellules cancéreuses dans l'organisme (impossible à visualiser à l'œil nu) et donc de déterminer des points limites plus prédictifs.

Lors de ce projet, 10 études de caractérisation de la croissance tumorale de différentes lignées de cellules tumorales seront réalisées. Pour chacune de ces études, 40 souris seront utilisées soit un total de 400 souris. 50 études d'évaluation de l'efficacité de différents traitements anti-tumoraux seront également réalisées. Pour chacune de ces études, 50 animaux seront nécessaires soit un total de 2500 souris pourront être utilisés. De ce fait, au maximum 2900 souris seront utilisées pour l'ensemble du projet.

Les souches de souris utilisées étant immunodéprimées, une attention toute particulière sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Au cours de chaque étude, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien-être de l'animal. Une pesée régulière (2-3 fois par semaine) sera également réalisée tout au long de l'étude après injection des cellules tumorales. Toute anomalie clinique observée sera rapportée à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférence avec les produits testés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc.).

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules anti tumorales.

6152. D'après l'OMS, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. On comptait effectivement en 2012, 8.2 millions de décès liés à la maladie. Le cancer colorectal est le second cancer, pour ce qui est de la fréquence, chez la femme (après le cancer du sein) et le troisième chez l'homme (après le cancer du poumon et celui de la prostate). Les cancers coliques ont une fréquence élevée en France : chaque jour, 100 personnes apprennent qu'elles ont un cancer colorectal.

Plus exactement, on découvre 33 000 nouveaux cas par an, et 16 000 personnes en meurent. Chez les non-fumeurs, ils sont la deuxième cause de mortalité par cancer.

A ce jour, il existe plusieurs types de traitements contre ces deux types de cancers reposant le plus souvent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la radiothérapie. Cependant, ces traitements ne permettent pas une rémission de ces cancers dans 100% des cas. Pour l'ensemble des cancers colorectaux, tous stades confondus, le taux de survie après 5 ans est de 57 %. Mais ce taux est très variable selon le stade du cancer au moment du diagnostic.

Il est donc important de développer de nouvelle génération de traitement anti-cancéreux. Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements anti-tumoraux innovants.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaires car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable un cancer car ces derniers peuvent toucher de nombreuses cellules et organes différents et présentent de nombreuses interactions cellulaires et humorales.

L'efficacité de ces nouveaux traitements anti-tumoraux sera testée sur un modèle murin immunodéprimé à la fois pour permettre une pousse tumorale et également pour empêcher toute réaction de rejet du traitement administré. Les cellules cancéreuses pourront être suivies par imagerie de bioluminescence au cours du temps. Cette méthode apporte plusieurs avantages. C'est une technique non invasive 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). Cette technique permettra également de visualiser le développement des cellules cancéreuses dans l'organisme (impossible à visualiser à l'œil nu) et donc de déterminer des points limites plus prédictifs (R de Raffiner). Lors de ce projet,

50 études d'évaluation de l'efficacité de différents traitements anti-tumoraux seront réalisées pour un total de 1285 souris.

Les souches de souris utilisées étant immunodéprimées, une attention toute particulière sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Au cours de chaque étude, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien être de l'animal. Une pesée deux fois par semaine au minimum (mais pouvant être plus fréquente en fonction de l'état clinique des animaux) sera également réalisée tout au long de l'étude après injection des cellules tumorales. Toute anomalie clinique observée sera rapporté à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférence avec les produits testés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc.)

6153. Les rongeurs sont à l'origine de pertes alimentaires énormes (environ 10% de la production mondiale), constituent un réservoir de plus de 40 pathogènes zoonotiques, et sont à l'origine de dégâts aux infrastructures. Il est donc nécessaire de contrôler leurs populations. Ce contrôle est actuellement fait en Europe par utilisation d'anticoagulants. Le problème est que ces molécules ont été récemment (juillet 2016) classées par l'Europe comme potentiellement reprotoxique. Cette classification est à l'origine de bouleversements majeurs pour la commercialisation de ces molécules.

Cette classification a été décidée sur la base des données disponibles sur un anticoagulant humain, la warfarine. Cette dernière a été très souvent utilisée chez des femmes enceintes en raison de problèmes thromboemboliques et son utilisation s'est parfois traduit par des anomalies fœtales avec un raccourcissement des os de la face. Sur la base de ces observations et du fait que les raticides anticoagulants ont le même mécanisme d'action que la warfarine, l'Europe, a préféré classer toutes les substances de la famille comme potentiellement repro-toxique. Or certaines de ces molécules se concentrent très fortement dans le foie et pourrait ne pas être disponibles dans la circulation générale. Dans ce cas, l'exposition fœtale serait quasi nulle. Ce protocole a pour but de comparer les paramètres pharmacocinétiques des molécules afin d'évaluer ce risque d'exposition fœtale. La détermination des propriétés pharmacocinétiques des molécules ne peut se faire qu'*in vivo* au moyen d'un modèle animal. Le choix du rat provient du fait qu'il s'agit de l'espèce la plus classique pour les études de toxicologie générale et de développement et reproduction. Le modèle rat est privilégié du fait de sa manipulation chirurgicale plus aisée et du volume plasmatique plus grand permettant des volumes de prélèvements en accord avec les techniques analytiques nécessaires à la détermination des concentrations en anticoagulants. Un minimum de 40 animaux par pharmacocinétique (10 échéance de temps post-administration et 4 animaux par échéance) seront requis pour évaluer les paramètres pharmacocinétiques. Sur une période de 5 ans, nous envisageons donc d'utiliser 1200 rats femelles matures sexuellement, pour évaluer la pharmacocinétique de 15 molécules avec 2 doses par molécule. Les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress et la souffrance causée par les tests. Tout sera mis en œuvre pour éviter que les expériences mènent à une souffrance trop importante, en particulier l'antidote des anticoagulants, la vitamine K, sera administré quotidiennement pour qu'aucun trouble hémorragique ne survienne. L'établissement de ces pharmacocinétiques et la détermination des paramètres pharmacocinétiques nous permettront éventuellement de valider un modèle *ex vivo* de foie isolé et perfusé qui nous permettrait de caractériser le piégeage hépatique des molécules. La mise au point éventuelle de ce modèle nous permettrait de réduire considérablement le nombre des animaux utilisés pour caractériser l'exposition fœtale.

6154. Depuis des siècles, des histoires mythiques concernant la morsure mortelle des *Varanus Komodoensis* font écho à travers les cultures locales. Jusqu'à quelques années, la gueule de ces varans était censée être chargée de bactéries mortelles provenant des cadavres en décomposition dont ils se nourrissent. Ce sont en fait des animaux très propres. Après s'être nourri, ils vont passer 10 à 15 minutes à se lécher les babines. En 2009, un chercheur et professeur renommé a démontré à l'aide d'image IRM et d'analyses bactériologiques et toxicologiques que les glandes salivaires modifiées des *Varanus Komodoensis* produisent des toxines anticoagulantes et que la flore buccale ne possède pas le pouvoir pathogène pour tuer. Quand les Varans du Komodo attaquent leurs

proies (porcs, cerfs, buffles d'eau), celles-ci se vident de leur sang en moins de 30 minutes par la blessure infligée par les dents du dragon du fait de l'état d'anticoagulation résultant de l'administration de toxines anticoagulantes. 15% des proies libérées meurent en quelques heures, du fait d'une faiblesse musculaire et d'une hypotension. Les propriétés anticoagulantes de la salive n'ont pu jusqu'à présent être démontrées que pour le varan de Komodo.

L'objectif de cette étude est de montrer le rôle de la salive (propriété anticoagulante et/ou septique) dans la prédation chez le Varan *Salvadorii* par rapport à d'autres espèces. Le Varan *Salvadorii* a été regroupé dans le même sous-groupe phylogénétique que le Varan du Komodo et le Varan *Varius*, deux espèces considérées comme venimeuses. Ces trois espèces sont très proches par leur anatomie et leur écologie. Le varan *Salvadorii* est une espèce carnivore et arboricole qui se nourrit principalement de rongeurs, et d'oiseaux. Trois parties composent cette étude: une étude de l'anatomie buccale du varan, une étude de la flore bactérienne buccale (qui sera caractérisée par des études *in vitro*) et une étude toxicologique de la salive (qui se fera par des études *in vitro* et *in vivo*).

Le témoin positif utilisé est le Varan du Komodo (venimeux) et le témoin négatif est le Varan *Albigularis* (non venimeux). Ce dernier se nourrit de petites espèces et d'insectes.

Les prélèvements salivaires s'effectueront sur des Varans en captivité en accord avec les vétérinaires responsables des zoos. Un soigneur aidera à la contention des animaux pendant les prélèvements de salive. Les prélèvements seront non invasifs. On prélèvera la salive à l'aide d'écouvillons stériles pour l'étude bactériologique et d'une micropipette pour l'étude toxicologique. Pour l'étude toxicologique, les prélèvements seront effectués moment du repas du Varan. Celui-ci mordant sa proie, il libère normalement les toxines qui se mélangent à la salive et qui sont ensuite inoculées en IM dans la proie.

Après collecte de la salive du varan, des études *in vitro* préalables seront effectuées. Des analyses bactériologiques de la salive et des tests *in vitro* de caractérisation de la coagulation en présence de salive de varan seront réalisées avant d'initier toute étude expérimentale sur animaux. Si ces études *in vitro* permettent de répondre à la question posée, l'étude expérimentale sur animaux ne serait pas effectuée.

Dans le cas où l'étude préalable *in vitro* ne permettrait pas de montrer la présence d'une possible activité sur la coagulation, nous effectuerons une étude *in vivo* sur des lots de souris, la souris étant un des composants du régime alimentaire du varan *Salvadorii*. Les manipulations sur animaux et le suivi clinique seront réalisées par du personnel qualifiée disposant du diplôme d'expérimentation animale niveau « applicateur » et accompagnant systématiquement l'étudiante vétérinaire. Sur 2 ans, 150 souris devraient être utilisées ce qui représente un nombre minimum nécessaire pour déterminer de façon fiable les conséquences cliniques d'une administration par voie intramusculaire de salive traitée préalablement selon un protocole permettant de la décontaminer. Nous réaliserons un essai au préalable de l'étude pour affiner le mode opératoire. Les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les animaux seront maintenus en groupe. Ils auront à disposition une alimentation standard et de l'eau *ad libitum*. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress pouvant être causée par le test. Les souris seront endormies puis euthanasiées après observation des premiers signes hémorragiques afin de limiter au maximum la souffrance.

6155. La tumorigenèse est influencée par des facteurs génétiques et environnementaux. Il est maintenant bien établi que la suralimentation et un déséquilibre du métabolisme peuvent conduire à l'obésité, au diabète et au cancer. L'obésité et le diabète de type 2 ont été identifiés comme facteurs de risque de plusieurs types de cancers, dont le cancer du foie. Une signalisation de l'insuline joue un rôle fondamental dans la régulation de la croissance. Cette voie, conservée au cours de l'évolution, est essentielle pour la régulation des lipides, le métabolisme du glucose et la croissance physiopathologique et est activée dans la majorité des cancers.

L'objectif de notre travail est de déterminer les mécanismes moléculaires et l'impact des altérations métaboliques sous contrôle de la voie de la signalisation de l'insuline dans la tumorigenèse du foie. Plus spécifiquement, notre objectif est d'élucider la contribution de la protéine kinase AKT2 et facteur de transcription PPAR $\gamma$ , les effecteurs en aval de la voie de l'insuline, dans la tumorigenèse du foie associée avec l'accumulation pathologique des lipides dans cet organe. Pour répondre à ces questions, nous allons utiliser des modèles murins obtenus à partir d'animaux transgéniques. Ces modèles sont caractérisés par une sur-activation de signalisation d'insuline et ils développent spontanément un cancer du foie avec la pertinence de 100%. Nous testerons sur eux l'impact de l'inactivation génétique et pharmacologique des différents acteurs moléculaires sur le métabolisme lipidique et la tumorigenèse. Spécifiquement, dans ce projet, nous générons des nouvelles lignées des souris knock-out avec des gènes d'intérêt (AKT2 et PPAR $\gamma$ ) inactivés sélectivement dans le foie pour tester leur impact sur la transformation métabolique et la transformation maligne des hépatocytes manifestée par les nodules tumoraux dans le foie. Nous allons combiner ces approches génétiques avec l'activation et l'inhibition pharmacologique de PPAR $\gamma$  (traitement des souris avec l'agoniste et l'antagoniste spécifique de PPAR $\gamma$ ) pour élucider son rôle dans le cancer du foie. L'originalité importante de notre travail est aussi de comparer les analyses du cancer du foie induit chimiquement avec le modèle génétique de l'activation de la signalisation de l'insuline.

Dans ce projet, le respect de la règle des 3R est assuré par les procédures mises en œuvre, notamment : anesthésie générale pour les procédures pouvant entraîner de la douleur, analyse de paramètres multiples chez chaque animal, obtention d'animaux contrôles et mutants dans les mêmes croisements, utilisation de tests statistiques adaptés. Le suivi régulier des animaux permettra d'éviter le développement de tumeurs trop invalidantes. Ce projet de cinq ans utilisera 340 animaux. Il apportera une meilleure compréhension des mécanismes de tumorigenèse hépatique et permettra le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

6156. Le projet a pour but d'évaluer un nouvel appareil de mesure non-invasif de la pression artérielle chez le chat.

L'hypertension artérielle (HTA) chez l'animal est méconnue du fait d'une symptomatologie fruste en début d'évolution. De plus, pour la majorité des praticiens vétérinaires, les appareils actuellement disponibles sur le marché sont difficiles à utiliser chez le chat. Objectifs :

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité d'un nouvel appareil de mesure non-invasif de la pression artérielle chez le chat qui rende la mesure de la PA plus aisée. La finalité du projet est de pouvoir diagnostiquer plus précocement les chats hypertendus et ainsi de les traiter au plus tôt.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être le stress et la gêne liés aux administrations de produits et aux variations de pression artérielle, ainsi que les mesures réalisées avec les dispositifs commerciaux actuels.

Informations sur les espèces utilisées :

Les études de ce projet seront réalisées sur l'espèce cible (le chat). Jusqu'à 120 animaux seront utilisés sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Pour évaluer un dispositif de mesure de la PA, le recours à des méthodes alternatives est insuffisamment informatif.

Le recours à l'espèce cible reste indispensable pour mettre au point et valider un dispositif de mesure de la PA chez le chat.

Réduction : les effectifs sont évalués au plus juste (connaissance des dispositifs déjà sur le marché, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chats utilisés en limitant le risque d'études non conclusives. Les animaux utilisés devront être représentatifs de la population féline générale en termes de sexe, poids, et autres particularités pouvant influencer sur la mesure de la PA.

Raffinement : Pour chaque étude, une période d'acclimatation systématique des chats est prévue dans le but de limiter leur stress. Même si aucune souffrance n'est attendue, une surveillance adaptée est mise en place pour assurer une prise en charge rapide des animaux si cela s'avérait nécessaire. Pour réduire l'inconfort et la gêne provoqués par l'administration de médicaments et les manipulations, des opérateurs qualifiés réalisent une contention adaptée de l'animal. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge pour maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés du milieu sont mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

6157. Outre les impacts sanitaires, la prolifération des rongeurs nuisibles est à l'origine de détériorations matérielles majeures en particulier par attaque des câbles électriques et électroniques. De nombreux exemples peuvent étayer ces propos. Ainsi, les compagnies d'assurance américaine estiment qu'environ 25% des feux dont la cause est inconnue sont dus aux rongeurs par grignotage des câbles électriques. Parmi les rongeurs, la souris est l'espèce la plus problématique. En effet, empêcher l'entrée des souris dans un local est extrêmement difficile voire impossible, en raison de leur petite taille et de leur capacité à déformer leur corps et donc à pouvoir s'immiscer à travers de très petits orifices.

L'objectif de ce projet est de tester la capacité d'un nouveau dispositif industriel à obstruer un orifice pour empêcher le passage de souris au travers de cet orifice. Seule l'expérimentation sur modèle concerné par le phénomène peut être envisagée et aucun autre test ne pourrait démontrer l'efficacité de ce produit. Un minimum de 10 animaux par groupe sera requis pour évaluer l'efficacité du produit afin d'avoir une pression intrusive au niveau de l'orifice obstrué suffisamment importante. Sur 5 ans, nous envisageons d'utiliser 2000 souris, pour nous permettre de réaliser 10 tests par an avec 2 lots en parallèle, et de répéter ces tests 1 fois. Les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les animaux seront maintenus en groupes harmonieux avec des moyens de se cacher la journée, comme le font les souris en milieu naturel, et de s'ébattre la nuit. En règle générale, les animaux auront à disposition une alimentation standard et de l'eau *ad libitum*. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress pouvant être causée par le test. Les animaux mis au contact du dispositif seront observés 3 fois par jour au minimum afin de s'assurer de l'absence de plaies pouvant être dues à des phénomènes de dominance ou au dispositif lui-même si les animaux essayaient de passer au travers. Si des animaux se blessaient, ces derniers seraient retirés de l'étude. Selon la gravité des lésions, l'animal pourrait être endormi puis euthanasié afin de limiter au maximum la souffrance.

6158. Ce projet consiste à tester une nouvelle approche de contrôle du développement de tumeur chez la souris. Pour cela, 80 souris de la lignée CB57Bl/6 seront utilisées afin d'établir l'efficacité de l'utilisation d'un composé X sur le développement d'une tumeur. Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 80 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation du composé X sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

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

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes, en animalerie A2 à raison de 5 souris maximum par cage de 530 cm<sup>2</sup> (365x207x140mm) dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Toute médication pouvant interférer avec l'utilisation du composé X est proscrite cependant les animaux sont suivis plusieurs fois par jour pour détecter d'éventuels signes cliniques précoces et pesés 3 fois par semaine pour permettre une prise de décision rapide en cas d'atteinte des points limites.

6159. Le contexte de notre étude est le développement de thérapies innovantes contre le cancer, en particulier les cancers résistants pour lesquels il n'existe pas de traitement efficace.

Dans ce cadre, l'objectif est de tester le potentiel de nanoparticules à cibler les tumeurs.

Les nanoparticules utilisées seront marquées avec un fluorophore.

Leur distribution sera suivie à l'aide d'un système d'imagerie optique de fluorescence du petit animal adapté pour une évaluation rapide et relativement peu onéreuse du niveau de fluorescence dans la souris.

Afin de déterminer les nanoparticules ayant la meilleure bio-distribution et ciblant le mieux les tumeurs. Dans ces projets, 20 nanoparticules différentes seront testées en faisant varier plusieurs paramètres :

- la forme

- la taille

- le type de greffage du fluorophore

- la présence ou non de ligands spécifiques des tumeurs.

Dans un premier temps une étude de cinétique sanguine du produit sera effectuée

Leur pharmacocinétique et le ciblage tumoral passif ou actif seront ensuite évalués par imagerie de fluorescence non invasive.

6 souris par nanoparticules pour la cinétique sanguine seront nécessaires, soit 120 souris. Pour la biodistribution par imagerie de fluorescence, 16 souris par nanoparticules seront nécessaires, soit 320 souris. Pour l'ensemble de cette étude, 440 souris seront nécessaires.

L'ensemble des nanoparticules testées *in vivo* ont été préalablement testées et validées *in vitro* dans plusieurs modèles cellulaires. Seules les molécules ayant la meilleure capacité à cibler les cellules tumorales seront testées chez l'animal. Les modèles expérimentaux animaux, et en particulier les modèles murins, sont les plus adaptés à l'étude de la biodistribution de nanoparticules marquées avec un fluorophore par imagerie optique *in vivo*. Ces modèles permettent d'avancer dans la mise au point de nouvelles thérapies anti-tumorales et procéder à leur évaluation pré-clinique avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail.

Remplacer :

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

Réduire :

A partir d'un grand nombre de molécules synthétisées par une équipe avec laquelle nous collaborons, les tests *in vitro* nous ont permis de réduire un maximum le nombre de molécules que nous souhaitons tester *in vivo*. De plus, l'approche statistique et l'expérience de l'équipe dans ce domaine, nous permet de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables.

Raffiner :

Afin d'employer au mieux les animaux, le protocole présenté a été optimisé afin d'obtenir le maximum d'informations sans augmenter la douleur infligée aux animaux.

6160. Le premier symptôme de la maladie d'Alzheimer (MA) est une perte légère de mémoire à court terme. Au cours de la maladie, les déficits deviennent plus importants et des modifications de la personnalité finissent par être observées. A ce jour, il n'existe pas de traitement de la MA, même si l'on parvient à en ralentir la progression. La maladie est caractérisée par l'accumulation, au sein du cerveau, d'une protéine appelée 'bêta-amyloïde', contribuant à la mort plus ou moins rapide des neurones. Une autre caractéristique de la MA est la perte d'un type particulier de neurones, dits 'cholinergiques', qui jouent un rôle central dans la mémoire et l'apprentissage.

Il existe une interaction entre la protéine bêta-amyloïde et certains récepteurs cholinergiques, dans une étape très précoce de la MA. Nous souhaitons étudier le rôle de cette interaction dans la maladie en développant des modèles *in vitro* utilisant des cultures cellulaires, mais également *in vivo*, par injection de la protéine bêta-amyloïde à des souris ayant une modification génétique pour le récepteur. Après un vieillissement destiné à se rapprocher au maximum de la pathologie humaine, les animaux seront soumis à des tests comportementaux pour évaluer leur mémoire.

Ces modèles permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans cette maladie et, sur le long terme, de développer des traitements potentiels. Ce projet utilisera jusqu'à 471 souris, dans 3 procédures de classe modérée, sur 3 ans.

Les expériences ont été conçues pour minimiser le nombre d'animaux en ayant recours à des tests statistiques appropriés. Les signes cliniques qui pourraient évoquer des altérations importantes du fonctionnement cérébral seront recherchés régulièrement pour éviter l'apparition de souffrance des animaux.

L'utilisation de cultures cellulaires permettra de diminuer le nombre d'animaux nécessaires mais l'utilisation d'un modèle *in vivo* est indispensable dans le contexte d'une maladie touchant principalement la mémoire.

6161. Chez les animaux d'intérêt agronomique, le risque d'échec précoce de la gestation est élevé : il réduit la performance de reproduction et l'efficacité économique dans les élevages.

Cet échec survient au moment de l'implantation de l'embryon dans la paroi de l'utérus (endomètre). Un dysfonctionnement de la fonction utérine serait en cause. Notre projet vise à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires contribuant au mécanisme de l'établissement de la gestation.

Chez les ruminants, l'implantation de l'embryon dépend des communications entre l'endomètre et l'embryon. Chez l'humain, la brebis et la truie il a été montré récemment l'existence dans le fluide utérin (obtenu par lavage de l'utérus) de petites vésicules sécrétées ayant la capacité de transporter des molécules entre cellules. Ces vésicules pourraient jouer un rôle clé dans la communication cellulaire entre l'endomètre et l'embryon pendant l'implantation.

Notre objectif est d'observer pour la première fois chez l'animal vivant l'entrée de vésicules provenant soit de la mère soit de l'embryon dans les cellules de l'endomètre maternel, grâce à de l'imagerie cellulaire *in vivo*.

La recherche de conditions optimales a nécessité l'utilisation de 8 brebis. Les deux dernières brebis ont permis de valider ces conditions pour visualiser la fusion des vésicules avec l'endomètre en microscopie. Afin de rechercher des marqueurs moléculaires montrant qu'un signal moléculaire est passé, nous envisageons l'utilisation de 8 animaux supplémentaires pour atteindre une significativité statistique suffisante.

Les résultats attendus doivent contribuer à une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réceptivité utérine et la reconnaissance maternelle de la gestation au cours de l'implantation chez ces animaux d'intérêt agronomique.

Le principe des 3R a été réfléchi comme suit :

Remplacement : Notre projet a débuté par une première partie *ex vivo*, sur des utérus ovins prélevés en abattoir afin de prédéterminer l'intérêt de notre étude : nous avons pu mettre en évidence la fusion des vésicules et des cellules utérines après 30 minutes d'incubation. Nous voulons désormais suivre cette fusion *in vivo*.

Réduction : Nous avons limité au maximum le nombre d'animaux (N=10) dans la partie mise au point par un protocole permettant d'adapter les conditions au cours de l'essai. Le recrutement de 8 animaux supplémentaires (avenant), qui seront traités avec les conditions déterminées grâce aux 10 premiers animaux, permettra d'atteindre une significativité statistique suffisante.

Raffinement : Nos brebis sont hébergées en groupes sociaux, sur litière de paille avec du foin de qualité à volonté. Les animaux resteront en groupes pour les mises à jeun afin d'éviter tout stress. Les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie générale avec un protocole analgésique adapté.

6162. Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques.

Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologies tente d'évaluer l'activité tumorigène des récepteurs de chimiokine. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogénèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ces acteurs présente donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux contre l'un des récepteurs à chimiokine. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de cette protéine avec un anticorps monoclonal bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter la protéine d'intérêt à des souris modifiées génétiquement pour sous exprimer cette molécule, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps contre cette molécule qui est reconnue dans ce modèle murin comme du « non-soi ». Le temps d'immunisation des souris sera d'environ 2 semaines.

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire *in vitro* des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'anticorps, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2x10).

La période minimum d'immunisation des souris est de 13 jours.

Dans la production d'anticorps, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.



6163. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la 1ère cause de handicap acquis et la 3ème cause de mortalité chez l'adulte en France. Actuellement le seul traitement approuvé en cas d'ischémie suite à un AVC est l'injection d'une molécule qui permet de dissoudre le caillot obstruant l'artère. Cependant pour bénéficier de cette thérapie la fenêtre d'intervention n'est que de 4.5 heures suite aux premiers symptômes, réduisant considérablement le nombre de patient pouvant être traité. Il est à noter que ce traitement est associé à un risque élevé d'œdème et de complications hémorragiques au cerveau. D'autre part, il n'existe actuellement aucun traitement à distance de l'AVC (+ de 24 heures). Dans le but de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour contrecarrer les effets délétères de l'AVC (inflammation, apoptose, cicatrice gliale, etc.), nous proposons d'utiliser les propriétés des cellules souches mésenchymateuses et des lipoprotéines HDL (High Density Lipoproteins) suite à un AVC ischémique. Les cellules souches mésenchymateuses du tissu adipeux sont des cellules multipotentes faciles à prélever. Elles sécrètent des facteurs de croissance et des molécules anti-inflammatoires qui agissent sur le développement et la protection des cellules environnantes. Ces cellules ont également des effets positifs sur la réduction de l'apoptose, la promotion de la croissance axonale et le remodelage synaptique ainsi que l'activation de la neurogènes et l'angiogenèse. Les HDL sont principalement connus pour leur rôle de transport retour du cholestérol vers le foie expliquant leur rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires. Mais, elles possèdent également des effets pléiotropes anti-inflammatoires, antioxydants, anti-protéases et anti-thrombotiques qui protègent les cellules endothéliales au cours d'une agression. L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de l'injection intracérébrale à l'aide d'un appareil de stéréotaxie de cellules souches issus du tissu adipeux ou de HDL directement au niveau du cerveau suite à une ischémie cérébrale induite chez la souris. Le modèle expérimental d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne au monofilament permet de reproduire le phénomène d'ischémie/reperfusion chez la souris avec un contrôle au niveau du temps d'occlusion de l'artère. Les fonctions motrices et sensorielles des souris seront évaluées sur une période de 4 semaines afin d'observer les effets de l'injection des cellules souches et des HDL sur la récupération fonctionnelle post- AVC. L'utilisation du modèle d'ischémie transitoire chez la souris par insertion d'un monofilament est couramment utilisée dans les études sur les accidents vasculaires cérébraux et permet de mimer les lésions subis par le cerveau. Il présente également l'avantage de reproduire *in vivo* les déficits neurologiques (perte neuronale, inflammation, cicatrice gliale) et comportementaux (déficits sensoriels et moteurs) observés chez les patients ayant subi un AVC. Durant les procédures chirurgicales, les animaux seront maintenus anesthésiés sous isoflurane et maintenus à une température constante sur un plateau chauffant afin d'avoir un état d'inconscience de qualité et de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse. Nous possédons l'expertise et l'expérience de ce modèle d'ischémie cérébrale chez la souris ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour l'expérimentation. Nous utiliserons un maximum de 80 souris C57/BL6 et les procédures expérimentales seront réalisées dans le respect des 3R.

6164. Les principaux déterminants conduisant aux pathologies associées au syndrome métabolique (obésité, diabète de type 2, hypertension...) incluent une prédisposition génétique ainsi qu'une prédisposition due à l'influence des facteurs environnementaux. Des études épidémiologiques montrent que l'environnement intra-utérin et par conséquent l'alimentation de la mère pendant la gestation joue un rôle particulièrement important. En cas de malnutrition, des processus adaptatifs complexes, mis en place au niveau de la mère et de l'enfant, vont laisser une empreinte au niveau du fœtus qui va perdurer tout au long de la vie de l'individu.

Notre projet consiste à identifier les mécanismes moléculaires mis en place et responsables de l'acquisition de l'empreinte chez les descendants afin de mieux comprendre l'installation de prédispositions à certaines pathologies pendant la vie adulte, tout en recherchant des marqueurs de sous-nutrition fœtale pouvant être transposable à terme en clinique, chez l'homme.

Ainsi, nous comparerons différents modèles de malnutrition périnatale pendant la gestation et/ou la lactation présentant des phénotypes métaboliques différents.

Sur la période de 5 ans sur laquelle se déroulera le projet, plusieurs expérimentations de stress nutritionnel périnatal seront réalisées (environ 4 sur cette période de 5 ans) de façon à générer des échantillons provenant 1) de la mère gestante, 2) de la mère allaitante, 3) des descendants à différentes périodes de leur vie (1 jour, 10 jours, 1 mois, 2 mois pour les périodes de croissance et 6 mois pour la période adulte) et ce pour chacun des lots. Ainsi, il est prévu de commander environ 140 animaux par an, soit 700 animaux et de générer environ 1000 animaux qui seront intégrés aux protocoles expérimentaux.

Les études porteront sur différents tissus (tissus adipeux, cerveaux, pancréas, testicules, sang, lait...) de façon à identifier 1) les marques épigénétiques mises en places (méthylation de l'ADN) et leurs conséquences sur l'expression des gènes 2) les facteurs responsables de la mise en place de ces marques 3) les marqueurs précoces utilisables en médecine humaine. Pour chaque expérimentation, 170 souris (140 femelles et 30 males) seront utilisées comme parents, les pères pouvant être utilisés pour plusieurs reproductions et les femelles servant par la suite de souris d'entraînement pour la mise au point de nouvelle techniques. Les animaux générés à chaque expérimentation sont estimés au nombre de 50 mâles (utilisés pour les expériences) et 50 femelles qui seront soit réutilisées comme mères pour celles issues du lot contrôle soit euthanasiées au sevrage. Ce projet sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et planifié dans le respect de la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction, Raffinement). Pour chaque expérimentation, 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.

La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de l'empreinte consécutive à un stress nutritionnel périnatal est une étape importante dans la compréhension des prédispositions aux pathologies associées au syndrome métabolique pendant la vie adulte. A long terme ces données pourront être utiles pour la définition d'une politique de prévention pour ces maladies qui représentent un enjeu majeur de santé publique.

6165. L'embolisation est une procédure de radiologie qui consiste à injecter à l'intérieur d'un vaisseau un agent d'occlusion. Le but visé est soit d'arrêter un saignement soit de dévasculariser un tissu pathologique irrigué par ce vaisseau. La technique est par exemple

couramment utilisée pour traiter les fibromes utérins en alternative à la chirurgie, ou encore les cancers du foie. Différents types d'agents d'embolisation peuvent être utilisés. Des billes calibrées sont choisies quand le praticien doit contrôler précisément à quel niveau boucher les vaisseaux. Pour les fibromes, on utilise des particules de large diamètre (>500µm) pour éviter l'embolisation non ciblée des artères ovariennes. A l'inverse pour les tumeurs hépatiques, on privilégie des particules de petits calibres (≤100µm) pour pénétrer à l'intérieur de la tumeur et épargner le tissu sain du foie. Le médecin doit donc être sûr que l'agent occlusif va boucher des vaisseaux correspondant à son calibre. De nouvelles billes qui ont été rendues radio-opaques sont actuellement développées. La visualisation des billes sur les images radiologiques permettra de savoir si elles ont bien atteint la tumeur ou si des billes ne sont pas parties dans des zones non visées, ou encore si l'ensemble de la lésion a bien été traitée.

Le projet a pour objectif l'évaluation de la distribution des microsphères d'embolisation radio-opaques sur un modèle de tumeur hépatique chez le lapin.

La taille du lapin permet l'utilisation des mêmes appareillages que chez l'homme, contrairement aux rongeurs. Le modèle tumoral utilisé est connu, reproductible, facilement implantable, à croissance rapide et transplantable dans de nombreux organes.

Le projet décrit l'implantation des cellules tumorales dans le foie de l'animal et la procédure d'embolisation de ces tumeurs. On estime que 15 lapins seront utilisés pour ce projet.

Les essais réalisés pourront faire partie des dossiers réglementaires pour demande d'autorisation de mise sur le marché.

Principe des 3R :

- Remplacement : Des tests *in vitro* sont réalisés dans les premières phases de développement des produits pour déterminer leurs propriétés physiques (granulométrie, élasticité) et éliminer les prototypes ne présentant pas des caractéristiques satisfaisantes. Un certain nombre de conditions du vivant ne peuvent être modélisées dans des systèmes *in vitro* : contact avec le sang, déformation des vaisseaux, réseaux vasculaires complexes tel que dans la tumeur, ce qui implique le recours à l'animal vivant.
- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données. Ce nombre est au minimum de 3 par groupe d'étude.
- Raffinement : des mesures préventives contre la douleur sont utilisées avec anesthésie générale gazeuse et analgésie par des morphiniques pendant et après les procédures susceptibles d'induire une souffrance. Pendant l'étude, un suivi quotidien des animaux est mis en place avec une évaluation quantitative de la douleur; la cause de la douleur est recherchée par des examens vétérinaires et sanguins afin de définir le moyen qui permettra de la réduire au maximum.

6166. Dans la filière avicole, *Escherichia coli* est l'agent pathogène bactérien le plus fréquemment isolé. Les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires (APEC) y provoquent différentes pathologies, toutes extra-intestinales. La colibacillose est fréquemment de forme respiratoire, avec une infection des sacs aériens qui peut évoluer en infection systémique et en septicémie mais d'autres formes se rencontrent chez le poussin (omphalite), les animaux plus âgés (cellulite, arthrite, ostéomyélite) et les pondeuses (salpingite/ovarite). La colibacillose affecte donc tous les niveaux de la chaîne de production et engendre d'importantes pertes économiques.

En raison de la grande diversité des souches APEC, la prophylaxie vaccinale n'est que très partiellement efficace et la lutte contre la colibacillose est essentiellement curative, impliquant le recours aux antibiotiques. Cependant, les attentes sociétales en matière d'élevage et d'environnement (bien-être et santé animale, réduction des intrants médicamenteux) et la récente législation qui restreint l'usage des antibiotiques dits d'importance critique en médecine vétérinaire (pour endiguer les problèmes d'antibiorésistance), rendent de plus en plus urgent le développement de moyens de lutte alternatifs, notamment prophylactiques. Le réservoir des souches APEC est l'intestin et elles n'y provoquent aucune pathologie. L'une des pistes envisageable est donc de défavoriser l'implantation des souches APEC au niveau intestinal au profit de la flore bactérienne commensale, grâce à l'utilisation d'additifs alimentaires. Ces additifs pourraient agir directement sur le microbiote par leurs propriétés antimicrobiennes mais également indirectement, par des activités diverses (écologiques, antioxydantes, immunomodulatrices,...).

Le présent projet vise à évaluer les effets d'additifs alimentaires identifiés comme pouvant jouer un rôle bénéfique sur le tractus digestif en favorisant la flore intestinale commensale et en défavorisant la colonisation de l'intestin par les souches APEC.

Pour ce faire, nous allons gaver des animaux dès l'éclosion avec une souche APEC puis suivre son implantation dans l'intestin, ainsi que l'évolution de la flore commensale, en fonction de la supplémentation de l'aliment. Ce projet utilisera 200 animaux.

Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement: L'effet d'additifs alimentaires sur la flore intestinale et le portage de souches pathogènes dans l'intestin, de par les différents mécanismes susceptibles d'être mis en jeu, ne peuvent pas être remplacés par des approches *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation pilote, preuve de concept.

Raffinement : Les animaux sont maintenus dans des hébergements adaptés en taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficient d'un enrichissement social et comportemental.

6167. La rentabilité économique et la survie des élevages de petits ruminants dépendent pour partie du contrôle des infections parasitaires au pâturage. Jusqu'alors, les traitements antiparasitaires permettaient de contrôler correctement les niveaux d'infestation par les vers parasites digestifs. Néanmoins, l'utilisation massive de ces molécules chimiques a conduit à l'apparition et l'émergence de parasites résistants. Actuellement, il n'existe aucune molécule pour laquelle il n'y a pas de cas de résistance décrit. Il est actuellement urgent de proposer des méthodes de contrôle alternatives qui intègrent l'ensemble des solutions disponibles. Parmi ces solutions, la sélection d'hôtes génétiquement résistants au parasite fait partie des plus importantes. Les généticiens sont parvenus à sélection de lignées divergentes (résistante et sensible) à l'un des vers parasites majeur chez les moutons. Notre projet vise à évaluer la résistance à ce parasite sur la 2ème génération de ces lignées divergentes pour caractériser le niveau de parasitisme entre les

animaux résistants et les animaux sensibles ainsi que pour évaluer le statut de résistance ou sensibilité des animaux de même génération à un autre vers parasite important chez les moutons. En effet, le déploiement de cette race de mouton résistante est conditionné par le fait qu'elle réponde aux critères d'élevage mais aussi qu'elle présente un niveau de sensibilité bas aux autres infections potentielles. Ainsi, dans ce projet, nous évaluerons le niveau de sensibilité à deux vers parasites de 40 ovins de génotypes sensibles (S) et 40 ovins de génotype résistants (R). La moitié de l'effectif (20 S et 20 R) sera infestée avec un ver parasite de la caillette et l'autre moitié (20R et 20S) avec un ver parasite de l'intestin. Ces ovins mâles et femelles sont de race Romane et seront infestés à l'âge de 3 mois, âge auquel le système immunitaire est suffisamment permissif pour que les vers s'installent correctement. Les animaux seront caractérisés au cours du temps pour leur capacité à résister ou non au parasitisme. A l'issue de cette première phase, cinq animaux résistants et cinq sensibles ayant été infestés avec *H. contortus* seront maintenus dans le protocole de manière à faire un suivi parasitologique aux cours d'infestations successives (idéalement 12 générations du parasite) et évaluer les capacités d'adaptation du parasite dans les fonds génétiques contrastés. Au total, 26 animaux seront euthanasiés, les autres seront replacés au sein du troupeau.

Les expérimentations seront menées dans le respect de la règle des 3 R. Remplacer : aucun modèle *in vitro* ne peut actuellement remplacer l'hôte pour la réalisation du cycle parasitaire. De plus, il s'agit ici de tester directement la sensibilité des génotypes de moutons au parasitisme. Réduire : Au cours d'expérimentations précédentes, nous avons obtenu un écart d'excrétion d'œufs de parasites d'un facteur 6 entre les deux lignées divergentes de moutons. Nous obtenons une puissance statistique de 100% avec un risque alpha de 0,05 si nous utilisons 20 animaux par groupe. Raffiner : les animaux seront hébergés en groupe, de manière à exprimer leurs comportements sociaux, avec de la litière sur paille. Des pneus suspendus régulièrement remplis de concentrés seront disposés dans les parcs.

6168. Les lésions traumatiques des nerfs périphériques comme l'écrasement du nerf sciatique constituent encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Ces lésions peuvent être causées soit par un écrasement, une compression, une section totale ou partielle du nerf, soit par un traumatisme suite à une intervention chirurgicale. Ces lésions traumatiques peuvent avoir une incidence importante sur la vie des patients d'un point de vue biologique et fonctionnel mais aussi d'un point de vue du stress psychologique et des contraintes sociales.

Les progrès de la microchirurgie, ces dernières années, ont constitué une étape importante dans la réparation et la régénération des nerfs périphériques grâce aux sutures et aux greffes nerveuses. Cependant, une récupération complète des lésions nerveuses périphériques reste vaine aujourd'hui, d'où la nécessité d'une recherche constante de traitements innovants. De plus, malgré ces avancées, les patients développent toujours des douleurs dites neuropathiques, ce qui constitue un problème majeur dans la mesure où elles sont rebelles aux traitements anti-douleurs classiques (anti-inflammatoires non stéroïdiens, morphiniques, etc.).

Des résultats récents ont montré que des nanoparticules d'adénosine couplés au squalène présentent des effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs dans des modèles d'accident vasculaire cérébrale (AVC) chez la souris et des modèles de lésions de la moelle épinière induites par écrasement chez le rat.

L'association de ces deux molécules, à savoir l'adénosine et le squalène, sous forme de nanoparticules présente de nombreux avantages au regard de l'efficacité thérapeutique et de la distribution de la molécule active au niveau du site de lésion et des tissus ciblés.

En effet, l'adénosine, un neuromodulateur, a sous sa forme libre une faible biodisponibilité due à une métabolisation (dégradation par les enzymes) rapide.

En outre, récemment, le squalène (un lipide naturel) a été proposé pour transporter de nombreux principes actifs, rapidement métabolisables et passant mal les barrières membranaires. Ainsi, l'adénosine couplé au squalène va prendre spontanément en milieu aqueux une forme nanoparticulaire (milliardième de mètre), protégeant de ce fait l'adénosine de la dégradation. Ces systèmes permettent d'amener les principes actifs avec des concentrations efficaces jusqu'à leur site d'action sans montrer d'effets secondaires ou de toxicité connus après injection chez les rongeurs.

L'utilisation de ces nanoparticules d'adénosine-squalène dans la réparation des lésions du système nerveux périphérique représente donc une nouvelle voie thérapeutique prometteuse. Elle constitue un espoir important pour la récupération fonctionnelle des membres lésés qui va dépendre du nombre de neurones qui va se régénérer et de la ré-innervation des voies motrices et sensitives.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité des nanoparticules d'adénosine-squalène sur la réparation nerveuse suite à un traumatisme nerveux périphérique chez le rat. Nous avons conçu un modèle de lésion périphérique du nerf sciatique (unilatérale) par compression afin d'étudier l'effet neuroprotecteur et neurorégénérateur du traitement avec les nanoparticules d'adénosine-squalène. La régénération du nerf sera mesurée sur des prélèvements tissulaires *post-mortem* par des méthodes d'immunohistochimie et de quantification du nombre de neurones présents après traitement chez les rats lésés. De plus, la récupération fonctionnelle du membre lésé sera évaluée grâce à différents tests comportementaux.

Les résultats de cette étude devraient ouvrir des perspectives d'application thérapeutique des nanomédicaments chez l'homme pour le traitement des lésions des nerfs périphériques.

Le rat constitue un bon modèle d'étude des lésions nerveuses périphériques car il possède une organisation nerveuse et un pouvoir de régénération comparables à ceux de l'homme. Il n'existe pas d'équivalent expérimental utilisant des systèmes de cultures cellulaires ou des systèmes de modélisation informatique permettant d'étudier les récupérations fonctionnelles après lésion, ce qui rend indispensable l'utilisation d'animaux vivants capables de sentir les stimuli appliqués et d'y réagir.

Le nombre de rats nécessaires à cette étude a été calculé grâce à une planification statistique minutieuse afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Il a été estimé à 576 rats sur 5 ans.

Nous possédons une forte expérience dans la manipulation et la minimalisation des conditions de stress auxquelles sont soumis les rats.

L'expérimentation sera réalisée dans des conditions de bien-être contrôlées et selon les standards d'hébergement établis, avec un accès à la nourriture et à la boisson facilité afin de palier à la diminution de mobilité. Les animaux seront anesthésiés pour éliminer la sensation de douleur pendant toute intervention invasive. Afin de réduire la douleur à son minimum, des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, seront déterminés.

Les procédures respecteront les recommandations du guide de l'association internationale pour les études sur la douleur.

6169. L'embolisation est une procédure de radiologie qui consiste à injecter à l'intérieur d'un vaisseau un agent d'occlusion. Le but visé est soit d'arrêter un saignement soit de dévasculariser un tissu pathologique irrigué par ce vaisseau. La technique est par exemple couramment utilisée pour traiter les fibromes utérins en alternative à la chirurgie, ou encore les cancers du foie. Différents types d'agents d'embolisation peuvent être utilisés. Des billes calibrées sont choisies quand le praticien doit contrôler précisément à quel niveau boucher les vaisseaux. Pour les fibromes, on utilise des particules de large diamètre (>500µm) notamment pour éviter l'embolisation non ciblée des artères ovariennes. A l'inverse pour les tumeurs hépatiques, on privilégie des particules de petits calibres (≤100µm) pour pénétrer à l'intérieur de la tumeur et épargner le tissu sain du foie. Le médecin doit donc être sûr que l'agent occlusif va boucher des vaisseaux correspondant à son calibre. De nouvelles billes qui ont été rendues radio-opaques sont actuellement développées. La visualisation des billes sur les images de suivi radiologique permettra de savoir si elles ont bien atteint le territoire ciblé ou encore si des billes ne sont pas parties dans des zones non visées, ou encore si l'ensemble de la lésion a bien été traitée.

L'objectif du projet est d'étudier la distribution dans les vaisseaux de microsphères d'embolisation radio-opaques. Les essais réalisés pourront faire partie des dossiers réglementaires pour les demandes d'autorisation de mise sur le marché.

Les tests doivent être réalisés dans les mêmes conditions et avec les mêmes matériels que chez l'homme. Ils sont par conséquent effectués sur des animaux de grande taille (lapin, porc et mouton). L'injection des produits est faite dans l'artère rénale de mouton. Les animaux étudiés dans ce projet proviennent de centres agréés et sont nés et élevés en captivité. L'étude portera sur un nombre maximum de 14 moutons, pour 1 an de la demande d'autorisation de projet.

Principe des 3R :

- Remplacement : Des tests *in vitro* sont classiquement réalisés dans les premières phases de développement des produits pour déterminer leurs propriétés physiques (granulométrie, élasticité) et éliminer les prototypes ne présentant pas des caractéristiques satisfaisantes. Un certain nombre de conditions du vivant ne peuvent actuellement être modélisées dans des systèmes *in vitro* : contact avec le sang, déformation des vaisseaux, réseaux vasculaires complexes, ce qui implique le recours à l'animal vivant.
- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données. Ce nombre est classiquement de 2 ou 3 par groupe d'étude. Les deux reins de l'animal sont traités et les prélèvements sur chaque rein sont multipliés pour réduire le nombre total d'animaux utilisés.
- Raffinement : La procédure d'embolisation est réalisée sous anesthésie générale.

6170. Ce projet étudie l'écologie évolutive des salmonidés dans le contexte de la colonisation d'îles de l'hémisphère sud par certaines espèces de salmonidés introduites il y a 60 ans. La truite est la seule espèce à avoir colonisé la quasi-totalité des bassins versants de la moitié Est de l'île étudiée. L'expérience initiée par ces introductions est d'un intérêt majeur, dans un contexte de réchauffement et de recul rapide des glaciers. Les bases de données et d'échantillons existants permettent d'explorer les questions scientifiques portant sur le succès des invasions et l'adaptation des espèces en relation avec les changements rapides de l'environnement. Un premier modèle d'invasion des rivières par la truite repose sur plusieurs hypothèses sur leur vie en mer et leurs capacités de dispersion qui sont à valider. Cette phase du cycle biologique est encore mal connue dans l'hémisphère nord (origine des salmonidés). Sur l'île étudiée, à partir de 12 rivières d'introduction, 42 abritent maintenant une population de truites anadromes (moitié Est de l'île). Les rivières de la moitié Ouest sont encore vierges de poissons et sont susceptibles d'être explorées ou colonisées. Notre objectif est de comprendre lesquelles sont explorées, à quelle fréquence, par combien d'individus, à quelle distance d'une rivière peuplée et quelles sont leurs caractéristiques (débit, accessibilité).

Un suivi par pistage acoustique de l'exploration des rivières par les truites de mer sera initié en front de colonisation. Des récepteurs acoustiques (rayon de réception 500m environ) répartis sur 10 estuaires, contrôleront le passage de truites portant un émetteur (fréquence 60-90 secondes, identité, salinité et température du milieu). Cinquante truites adultes (1,5 - 8kg) seront capturées à la ligne. Après anesthésie, elles seront mesurées, pesées, sexées. Quelques écailles et 0,5 à 1ml de sang seront prélevés (histoire de vie, génétique, physiologie). Les émetteurs (9,9 x 43mm) seront implantés sous la nageoire dorsale à l'extérieur de la truite (salinité et température de l'eau mesurées à l'extérieur de l'animal).

Les sites de captures sont situés dans une baie (10 x 3km) dont la sortie est contrôlée par des récepteurs. Les détections permettront de connaître le sens des déplacements dans les gradients de salinité et de température. La mortalité (naturelle et prédation) sera estimée à partir des poissons détectés uniquement dans la baie cessant d'être actifs au cours de l'expérience. L'effectif et le comportement des poissons "dispersants" sera connu grâce aux détections dans les estuaires (15km de part et d'autre de la baie). Les dispersants "longue distance" seront ceux qui seront sortis de la baie et ne seront jamais détectés sur les estuaires équipés, après déduction de la mortalité estimée dans la baie.

Sur la même période, nous procéderons également à des pêches électriques de contrôle de la partie aval des rivières pour suivre l'invasion. Les poissons seront anesthésiés, pesés, mesurés et subiront un prélèvement d'écailles avant d'être relâchés (maxi 1000 individus, tous stades de développement).

- Remplacer cette expérience par d'autres moyens de recherche ?

Cette situation expérimentale fortuite est unique. Il est impossible de la répéter. Les autres introductions de salmonidés n'ont jamais fait l'objet d'un tel suivi. Il n'existe aucune référence dans la littérature sur la colonisation naturelle de rivières vierges de poissons. Il faut donc tirer le meilleur parti de cette opportunité, qui permettra d'anticiper ce qui se passera dans quelques dizaines d'années dans les régions froides de l'hémisphère nord et permettre aux structures en charge de la gestion piscicole et de l'environnement de gérer au mieux ces situations. - Réduire le nombre de sujets expérimentés ?

L'introduction des truites sur l'île constitue une vraie expérience d'introduction, avec un suivi remarquable depuis l'origine. Elle est unique au monde et maintenant irréalisable car il est évidemment interdit d'introduire volontairement une espèce exogène dans une réserve naturelle. Il est donc important d'en tirer le meilleur parti pour améliorer nos connaissances générales sur les mécanismes des invasions (2ème cause d'érosion de la biodiversité). Nous devons disposer d'un effectif suffisant pour parvenir à quelques conclusions sur les dispersants (condition, physiologie, âge, distance parcourue). Certaines truites peuvent disparaître (mortalités). Le marquage de 50 truites permettra de disposer de résultats significatifs.

- Raffinement des méthodes ?

La capture de poissons en eau douce s'effectue par pêche électrique. Cette méthode est peu nocive lorsqu'elle est bien maîtrisée (intensité, durée de l'électronarcose), mais inefficace en eau salée. La pêche au filet provoque des blessures et ne permet pas de maîtriser le nombre de captures simultanées (risque de stabulation longue avant le relâcher). La pêche à la ligne avec un hameçon simple sans ardoillon permet de capturer les poissons un par un pour les traiter immédiatement. Le pêcheur amène le poisson près du bord, le prélève dans une large épuisette à fond plat et le transporte dans un bac d'anesthésie près de la berge. L'opération (mesurations, prélèvements, marquage) dure 5-7 minutes. Le poisson est ensuite sous surveillance dans une zone calme de berge. En quelques minutes il nage et s'éloigne à sa convenance.

L'implantation des émetteurs est généralement réalisée dans la cavité générale (incision ventrale et suture). Nous avons préféré l'implantation externe car:

- les truites étant capturées avant la reproduction, l'incision ventrale peut nuire aux comportements reproducteurs et provoquer des blessures graves lors des creusements,

- le marquage externe a fait ses preuves. Il permet une excellente survie sans infection. Il a souvent permis d'observer des saumons en migration de reproduction,

- Le risque d'infection est réduit dans les eaux froides. Nous n'avons jamais capturé de poissons présentant des infections,

- Les émetteurs sont petits (9,9 x 43mm). Leur poids (3g dans l'eau ; 6.5 g dans l'air) correspond au maximum à 0,4% du poids du poisson (recommandations : 2%).

6171. Malgré tous les progrès réalisés ces dernières années, le cancer colorectal reste toujours la troisième cause de décès par cancer dans le monde. Détecté à un stade précoce, il est de bon pronostic avec environ 90% de guérisons, mais lorsqu'il est découvert tardivement et qu'il présente des métastases, les chances de survie sont très faibles. Le récent développement de nouveaux médicaments dits « ciblés », comme le cetuximab, ont permis d'améliorer la prise en charge d'une proportion significative de ces patients. Malheureusement, la majorité d'entre eux sont résistants à ce traitement. Il est donc urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de traiter ces patients.

De manière intéressante, nos résultats sur les cellules en culture indiquent que le nilotinib, un médicament déjà développé pour soigner certaines leucémies, pourrait permettre de re-sensibiliser des cellules de cancers colorectaux résistantes au cetuximab. A terme cette étude pourrait donc permettre l'application rapide de ce nouveau traitement aux patients atteints de cancer du côlon et à la mise en place d'un essai clinique de phase I.

Le but de ce projet est donc de valider l'efficacité de cette nouvelle combinaison de thérapies ciblées (cetuximab+nilotinib) sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique, pour cela nous souhaitons utiliser différents modèles murins :

- un modèle de greffes sous-cutanées
- un modèle de métastases hépatiques (greffes intra-spléniques)
- un modèle de xéno greffes orthotopiques intra-caecales,

En effet à ce stade du projet, il n'y a pas de méthode alternative, car la dissémination tumorale est un phénomène extrêmement complexe impossible à réaliser *in vitro* sur des cultures cellulaires.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit au minimum après calcul de l'échantillonnage nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante. En raison de la variabilité de prise de greffes avec les modèles intraspléniques et orthotopiques (données de la littérature et de nos résultats préliminaires), des effets attendus des traitements, des tests statistiques choisis et après vérification et après vérification de la puissance statistique sur le logiciel G\*Power (t-test Wilcoxon- Mann-Whitney test; one tailed ;  $\alpha$  0.05 ; power 0.95 ; effect size d 1.77), 8 souris par condition de traitement sont nécessaires pour que les données aient une pertinence statistique. La taille des tumeurs primaires, l'aire des métastases hépatiques/aire totale des foies et les données de bioluminescence seront analysées par un test non paramétrique de de Mann-Whitney pour comparer deux groupes, ou d'un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunn's pour comparer plus de deux groupes

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 192 souris sur une durée de 4 ans.

Grâce à l'utilisation de cellules tumorales exprimant la luciférase, la prolifération tumorale sera suivie par imagerie non invasive de bioluminescence. Cette imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les protocoles expérimentaux car chaque animal est son propre contrôle, puisqu'il n'y a pas de sacrifices à chaque temps d'imagerie. En outre, l'imagerie permet de raffiner le projet puisqu'elle fournit des informations complémentaires aux techniques classiques *ex-vivo*.

6172. L'hypogonadisme hypogonadotrope est une maladie qui touche 1 individu sur 5000. Les hommes qui en sont atteints ont des taux circulants d'hormones LH et FSH très bas. La conséquence directe de cette perturbation hormonale est, entre autre, une spermatogénèse altérée : ces hommes sont infertiles. Lorsqu'ils souhaitent avoir un enfant, ils sont traités par des hormones de substitution pendant environ 3 à 24 mois. Ces traitements sont longs et fastidieux car ils nécessitent 5 injections par semaine pendant toute la durée du traitement.

Nous avons développé une molécule potentiellement capable de traiter l'hypogonadisme avec une meilleure efficacité (durée de traitement plus courte), et un traitement moins contraignant pour le patient car les injections seraient beaucoup plus espacées. Pour confirmer notre hypothèse, nous allons réaliser des expériences sur 2 modèles animaux :

- le modèle du rat adulte : les rats sont traités de façon médicamenteuse pour les rendre hypogonadiques. Cette inhibition est réversible après arrêt du traitement.

- le modèle des souris hpg qui possèdent une mutation qui les rend hypogonadiques de naissance.

Au total, environ 720 rats et 648 souris seront nécessaires sur 5 ans. Les paramètres relevés (poids des testicules, poids des vésicules séminales, réserves spermatiques, concentration de testostérone) seront comparés à l'aide d'un test de variance non paramétrique (Kruskal-Wallis) suivi d'un test post-hoc tel que le test de Dunn.

REPLACEMENT : L'hypogonadisme ne peut être mimé par des systèmes *ex vivo* ou *in vitro*. Il peut être étudié chez des animaux hypophysectomisés. Etant donné la lourdeur d'une telle procédure pour les animaux et l'incertitude des résultats, nous nous sommes orientés vers des modèles moins invasifs et non douloureux pour l'animal. Nous allons utiliser les 2 modèles qui respectent le mieux le bien-être animal.

REDUCTION : Les lots seront constitués de 4 animaux, pour obtenir une puissance de test de 80% avec un seuil de risque alpha de 0.05.

RAFFINEMENT : Les conditions d'hébergement des animaux ne seront pas modifiées. Il y aura un enrichissement du milieu par ajout de copeaux (permet aux animaux de former des nids), et de jouets (loft rongeurs ou Dome Home) pour les rats et les souris. En cas d'isolement ou de prostration, ou de perte de poids d'un animal supérieur à 10% de son poids initial, l'expérimentation sur cet animal sera immédiatement interrompue. Le seul acte réalisé sur l'animal vivant est une injection par voie sous-cutanée.

6173. Le phosphore d'origine alimentaire est un élément indispensable au bon développement du squelette chez le poulet. Cependant, son absorption digestive pourrait être réduite par la présence de fibres végétales issues de matières premières locales. L'objectif de l'étude est donc d'apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes de désassemblage des fibres dans le tractus digestif du poulet et les liens avec l'absorption de phosphore en fonction des régimes administrés.

Un total de 210 poulets sera utilisé. Les animaux seront élevés en groupe pendant 2 semaines. Au 15<sup>ème</sup> jour, 144 poulets de poids homogènes seront répartis en cages individuelles (collecte des fientes pour évaluer la digestibilité de phosphore). L'objectif est d'augmenter la fixation de phosphore dans le squelette et de réduire les rejets dans l'environnement.

Le protocole respecte le principe des 3R :

- remplacement : l'utilisation digestive du phosphore chez le poulet de chair fait intervenir un ensemble de mécanismes complexes. La construction d'un modèle *in silico* ou *in vitro* pour prédire ces phénomènes n'est pas possible à cause du manque de données. Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

- réduction : le nombre d'animaux a été réduit à son minimum en tenant compte 1. De la mortalité éventuelle dans les premières semaines, 2. De la distribution et l'homogénéité des poids des animaux attendues au moment de la procédure expérimentale et 3. De la puissance permettant de montrer une différence significative entre traitements et pertinente d'un point de vue biologique sur le critère de digestibilité fécale de phosphore.

- raffinement : pour limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux, plusieurs mesures seront mises en place. Les poussins seront hébergés au sol en groupe pendant 2 semaines à une densité très inférieure au maximum autorisé. Un minimum de 4 poussins par groupe est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins et respecter la taille moyenne d'une couvée. La durée de la procédure expérimentale sera limitée à 2 semaines. Des enrichissements appropriés du milieu de vie (au sol et en cage individuelle) seront mis en place. Les animaux seront visités au moins une fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans les points limites engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

6174. Le projet concerne l'élevage de poux de corps sur lapins. Les poux d'élevage sont des poux de corps humains qui ont été sélectionnés pour leur capacité à se nourrir de sang du lapin pour la survie et l'entretien de leur population. Le lapin est donc la seule espèce animale disponible pour cet élevage.

Dans le cadre de la recherche fondamentale et appliquée sur quelques ectoparasites et acaricides (acariens), notre élevage nous permet de mieux connaître les poux (comportement, aptitude à la survie, acquisition de résistance à certains produits) afin de mieux les combattre en conseillant et en testant l'efficacité pédiculicide et lenticide des produits anti-poux pour le compte de l'industrie pharmaceutique. L'élevage de poux nous permet donc de mieux les combattre en contribuant à la mise au point de certains modes opératoires en étroite collaboration avec les industries pharmaceutiques et à la diffusion des connaissances nécessaires à la lutte contre la pédiculose auprès des services scolaires, de santé et du public confronté à cette infestation (interventions dans les écoles, les centres aérés, conseils aux familles).

Pour cela nous utilisons 4 lapins sur une durée de 3 ans soit 8 lapins pour les 5 années du projet dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Les poux de corps d'élevage se nourrissent exclusivement par nourrissage direct sur le lapin qui ne peut pas être remplacé par un nourrissage *in vitro*.

- Réduction : Dans l'idéal, les poux devraient être nourris chaque jour. Le nombre de repas est limité à 4 par semaine afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires.
- Raffinement : Les lapins sont hébergés en accord avec les directives européennes à 2 par cage dans un environnement enrichi (tablette pour grimper, foin et carottes de culture biologique). A la fin des 5 ans, les lapins seront placés si possible.

6175. La consommation de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques, rapportées dans le rapport de l'OMS (2015) ont été consolidées par des études expérimentales à l'aide de modèle animaux qui ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : le fer sous forme hémique est proposé comme le principal responsable de cet effet promoteur. Cette promotion du risque de cancer colorectal par le fer hémique, est expliquée par une forte oxydation des lipides et formation de composés toxiques avec les nitrites des charcuteries. Compte tenu de cette forte association de l'effet promoteur des viandes rouges et charcuteries avec cette formation de composés toxiques, ce projet va évaluer l'effet de différents apports en antioxydant (tocopherol) pendant la fabrication des charcuteries ou pendant l'élevage des cochons sur la limitation de la formation de ces composés toxiques et sur la promotion de la carcinogenèse colorectale chez le rat après consommation de la charcuterie. Dans le cadre de ce projet, l'objet de la présente demande est de comparer dans un modèle animal classiquement utilisé pour étudier la relation aliment/cancer (50 rats Fisher F344 males de 5 semaines seront utilisés dans le respect du principe des 3R) différents apports en tocopherol sur la modulation des marqueurs précoces de cancer et sur les marqueurs fécaux et urinaires des composés toxiques, lorsque le tocophérol est apporté dans la charcuterie pendant sa fabrication ou pendant l'élevage du porc dans sa ration. L'utilisation d'un modèle animal est indispensable, car nous travaillons avec un aliment promoteur du cancer. (L'expérimentation chez l'Homme est donc impossible et aucun modèle cellulaire ne permet de modéliser le lien aliment/cancer). Leur nombre sera réduit autant que possible pour permettre néanmoins d'obtenir des résultats fiables. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Sera suivi le nombre des lésions précancéreuses au niveau du côlon, ainsi que des marqueurs de l'oxydation des lipides dans les fèces.

6176. Les mucopolysaccharidoses (MPS) sont des maladies génétiques rares dues à un déficit en enzymes responsables de la dégradation des chaînes de polysaccharides (sucres complexes) liées aux protéoglycanes en sucres simples. Ce déficit entraîne une accumulation anormale (« surcharge ») des glycosaminoglycanes (ou mucopolysaccharides) dans les cellules, les tissus et les organes. Il existe 7 types de MPS. La nature des glycosaminoglycanes (GAG) qui s'accumulent anormalement variant en fonction de l'enzyme déficiente. Par exemple, pour la mucopolysaccharidose de type VI (MPS de type VI), ou maladie de Maroteaux-Lamy, c'est l'arylsulfatase B qui est déficiente et ce sont les dermatanes sulfate et les chondroïtines sulfate qui s'accumulent. Cette accumulation se produit surtout dans les os et les articulations, les oreilles, les yeux et le cœur et entraîne généralement des anomalies osseuses, une petite taille, une surdité, une cécité et une atteinte cardiaque. L'efficacité des traitements actuelle reste limitée par le fait que les enzymes recombinantes, traitement de référence, ne traversent pas les barrières hémato-encéphalique et hématooculaire et sont très mal distribuées dans les tissus faiblement vascularisés comme les cartilages. Le besoin médical reste donc très important pour ces patients qui sont lourdement handicapés par la maladie. Notre entreprise, dispose de composés qui modulent la synthèse des GAGs et notamment des dermatanes sulfate (DS) et des chondroïtines sulfate (CS) qui s'accumulent dans les MPS VI, I, II et VII. Ces molécules initialement développées en clinique pour leurs propriétés anti-thrombotiques, constitueraient donc une promesse thérapeutique pour les MPS où les DS et les CS sont accumulés. Une première preuve de concept *in vitro* a été obtenue sur des fibroblastes d'un malade atteint de la MPS VI. Une preuve de concept doit maintenant être obtenue sur des modèles animaux des MPS. Nous estimons à environ 5000 le nombre d'animaux (souris et rats) utilisés dans les études dédiées à ce projet. Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux. L'anesthésie et l'analgésie seront également utilisées en fonction des besoins. Les doses d'IVA 336 administrées sont très inférieures à la LOEL, évitant les risques des souffrances induites par le composé.

6177. Le diabète de type 2 est considéré comme un problème majeur de santé publique, affectant plus de 350 millions de personnes dans le monde. Il est connu qu'une forte augmentation de la production de glucose par le foie pourrait être à l'origine de l'hyperglycémie des diabétiques.

Nos recherches sont centrées sur les mécanismes par lesquels les organes producteurs de glucose (le foie, le rein, et l'intestin) participent au contrôle de l'homéostasie glucidique et énergétique. Au cours des années précédentes, nous avons montré qu'une induction de la production intestinale de glucose (PIG) exerce, contrairement à la production hépatique de glucose, un rôle bénéfique sur le métabolisme glucidique et énergétique. Le glucose produit par l'intestin active un signal nerveux trouvant son origine dans la zone hépato-portale ("signal glucose portal"), et qui se traduit, au niveau central, par une induction de la satiété, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une diminution de la production hépatique de glucose.

Ce mécanisme a permis d'apporter une explication moléculaire aux effets de satiété induits par les protéines alimentaires. Ces effets bénéfiques sont abolis chez les souris invalidées spécifiquement dans l'intestin pour la glucose-6-phosphatase (souris I.G6pc-/-), l'enzyme clé de la production endogène de glucose. Ces souris nourries en régime standard présentent toutes les caractéristiques d'un état pré-diabétique (légère augmentation de la glycémie à jeun et de l'insulinémie, associée à un défaut de sensibilité et de sécrétion d'insuline et d'une intolérance au glucose). De plus, ces souris développent plus rapidement un diabète que des souris contrôles lorsqu'elles sont sous un régime riche en gras et en sucre (High Fat/High Sucrose=HF/HS).

Au contraire, les souris sur-exprimant la glucose-6-phosphatase spécifiquement dans l'intestin (souris I-overG6pcst) représentent un modèle de protection contre le développement de l'obésité et du diabète. En effet, ces souris prennent moins de poids que les souris contrôles en régime standard ainsi qu'en régime HF/HS.

L'objectif de ce projet est de caractériser les mécanismes par lesquels la production de glucose par l'intestin participe à la protection (souris I-overG6pcst) ou au développement (souris I.G6pc-/-) du diabète de type 2. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement de l'obésité et du diabète, en ciblant la production intestinale de glucose.

Nos études réalisées dans différentes conditions nutritionnelles nous permettrons d'étudier les effets métaboliques de la PIG dans un état physiologique (régime standard) et pathologique (régime HF/HS).

Le métabolisme glucidique et énergétique sera mesuré *in vivo*, comme chez l'homme, par des tests de tolérance au glucose et à l'insuline, des mesures de glycémie et un suivi de poids et de prise alimentaire. Ces souris seront élevées et hébergées par groupe 3-4 souris par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé. Les souris I-G6pc-/- et I-overG6pcst ne présentent aucun signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles.

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

La nécessité d'avoir recours à des animaux dans ce projet est d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire. Le nombre total d'animaux, soit 396 souris, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous effectuerons certains tests sur les mêmes souris, à une semaine d'intervalle entre chaque test. Par souci de raffinement les procédures sont maîtrisées au sein du laboratoire et la connaissance du modèle animal permet de définir des points limites (hypoglycémie, prostration, ...). Le suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance.

6178. La chimiothérapie de référence dans le cancer pancréatique est la gemcitabine (Gemzar). La gemcitabine nécessite un transporteur membranaire pour pénétrer dans la cellule. Le taux d'expression de ces transporteurs est variable selon les cancers pancréatiques. Les patients présentant un faible taux d'expression sont peu exposés au cytotoxique et présentent un risque élevé d'échec thérapeutique.

Les VHH, aussi appelé nanobody sont des domaines d'immunoglobulines mono-chaines de camélidés. L'intérêt des VHH réside dans leur faible poids moléculaire ~ 15 kDa comparativement aux anticorps monoclonaux ~150kDa, leur bonne solubilité et leur stabilité intrinsèque. Néanmoins, les VHH ont une faible demi-vie, afin d'augmenter celle-ci, nous avons choisi des VHH se fixant à la transferrine, protéine ayant une demi-vie de 7 jours.

De plus, d'après des données issues de la littérature, le récepteur à la transferrine dans le cancer du pancréas est surexprimé.

Les VHH ciblant la transferrine devraient, par conséquent, avoir une demi-vie augmentée de l'ordre d'une semaine, se concentrer préférentiellement au niveau de la tumeur pancréatique et permettre à la gemcitabine d'être internalisé indépendamment des transporteurs membranaires usuels.

L'objectif de ce projet est de réaliser, dans un premier temps, un suivi de deux VHH anti-transferrine pour étudier leur bio-distribution et leur élimination. Puis d'étudier, dans un deuxième temps, l'efficacité d'un VHH anti-transferrine couplé à la gemcitabine (Antibody-Drug-Conjugate c'est à dire des anticorps couplés à un médicament) par rapport à la gemcitabine seule dans le cancer du pancréas.

A cet effet, 40 souris nues seront xéno greffées par voie sous cutanée avec une tumeur d'origine humaine de cancer du pancréas de type PANC1.

- Dans le cadre du suivi de la biodistribution et de l'élimination des deux VHH anti-transferrine, les deux VHH seront marqués par des fluorophores différents et deux lots (A et B) de 5 souris seront étudiés. Lot A : suivi des VHH seuls, lot B : suivi des VHH préalablement incubés avec la transferrine humaine. Cette étape permet de sélectionner le VHH en fonction de leur bio-distribution et de leur demi-vie dans la souris.

- Dans le cadre de l'étude de l'efficacité de l'ADC versus la gemcitabine, trois groupes de 10 souris xéno greffées avec une tumeur pancréatique de type PANC1 transfectée stable par la luciférase. Le suivi de la réponse (mesure des masses tumorales) sera réalisé par imagerie en bioluminescence, permettant de mesurer les tumeurs de façon non invasive.

Les VHH et les ADC ont été au préalable testés et sélectionnés *in vitro* sur la même lignée cellulaire, PANC1.

Le nombre d'animaux utilisé a été calculé et maintenu minimal tout en générant le maximum d'information exploitable scientifiquement. Les points limites attendus sont la croissance tumorale au-delà d'une masse de 1,5g et tout signe de détresse ou souffrance recherchés avec une grille de score.

Toutefois, la localisation de la xéno greffe (sous cutanée avec croissance essentiellement externe), le faible risque d'essaimage métastatique et la nature des expérimentations conduites (administrations intra-péritonéales, imagerie non invasive, prélèvements sous anesthésie) ne devraient pas entraîner de douleurs particulières, mais elles seront tout de même prises en charge préventivement par l'administration de paracétamol. A ce titre, cette étude s'inscrit pleinement dans le respect de la règle des 3R : remplacer, réduire, raffiner, en accord avec l'article 5 chapitre II de l'arrêté du 21 février 2013. L'enrichissement des cages est prévu avec des tunnels en carton et des igloos. Les expérimentations et l'hébergement seront effectués dans des pièces différentes.

6179. Au cours de ces dernières années, des avancées significatives ont été réalisées dans le suivi clinique de la survenue de maladies cardiovasculaires qui représentent la première cause de mortalité au monde dans les pays développés. De nouvelles approches et notamment de nouvelles molécules sont actuellement utilisées aussi bien en prophylaxie qu'en chirurgie interventionnelle pour traiter les thromboses veineuses ou artérielles proximales et leurs récidives.



Les molécules anti-thrombotiques classiquement utilisées chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires sont soit des dérivés de l'héparine (non fractionnée ou de faible poids moléculaires) soit des agonistes de la vitamine K ou encore de l'aspirine. Cependant ces anti-thrombotiques présentent des effets délétères pouvant être fatals tel que le risque de saignement majeur qui touche tous les ans 2% de la population traitée. Chez certains patients notamment les personnes âgées ces anti-thrombotiques sont difficiles à administrer. En effet, ils nécessitent des administrations soit en perfusion continue soit en multi-injections sous cutanées, et dans la plupart des cas des prélèvements sanguins sont également nécessaires pour déterminer l'intensité d'action de l'anti-thrombotique et ajustement sa dose.

Dans cette optique, des méthodes physiques tel que l'électrostimulation pourrait présenter un avantage sur le bien être des patients et peut être sur la survenue du risque de saignement majeur.

L'étude que nous souhaitons effectuer est réalisée en partenariat avec l'entreprise qui a mis aux points le système d'électrostimulation. Le but de cette étude est d'étudier 1) la cinétique de thrombose (accumulation de plaquettes et de fibrine), les temps de saignement chez des animaux soumis à des électrostimulations 2) étudier l'effet de rémanence de cette électrostimulation 3) pour finir comparer les cinétiques de thrombose, d'accumulation de fibrine et les temps de saignement chez des animaux soumis à des électrostimulations à ceux d'animaux sains (contrôles) et à ceux d'animaux sous traitement anti-thrombotique tels que des agonistes de la vitamine K (warfarine), ou des antiplaquetaires tel que le clopidogrel et l'aspirine.

Aucune méthode non-animale ne peut être utilisée pour ce projet car un organisme intégré est nécessaire.

Ce projet nécessite un total de 139 souris. Dans le but de respecter la règle des 3R, le nombre de souris a été calculé au plus juste pour obtenir une différence significative suivant les différentes techniques utilisées. Dans un souci d'utilisation d'un nombre minimal d'animaux, le nombre total d'animaux annoncé (139) pourra ne pas être atteint. En effet si une différence significative est obtenue entre les groupes expérimentaux la totalité des lots annoncés ne sera pas utilisé. Dans la mesure du possible plusieurs tests seront pratiqués à partir des mêmes animaux comme le temps de saignement et les prélèvements pour déterminer les taux de D-dimères (reflétant dégradation de la fibrine) et les temps de génération de prothrombine (INR) grâce à l'utilisation d'appareils de cliniques ambulatoires. Lorsque seul le temps de saignement sera effectué sur les animaux, ils seront intégrés dans d'autres protocoles déjà évalué par le Comité d'éthique après un minimum de 15 jours de stabulation. Les souris sont hébergées par groupe de 5 avec comme enrichissement du coton pour nidification ou des dômes. La totalité des expérimentations sera effectuée par du personnel compétant sous anesthésie générale volatile pour les gavages et les électrostimulations. Afin de limiter la douleur que pourrait engendrer l'électrostimulation les animaux recevront une dose d'analgésique avant chaque électrostimulation. Les expérimentations de microscopie intravitale sont des expérimentations sans réveil et sont réalisées sous anesthésie générale injectable. Les animaux sont maintenus sous anesthésie profonde durant toute l'expérimentation puis euthanasiés par un excès d'anesthésique.

6180. Le laboratoire développe une nouvelle formulation (solution de polymères biodégradables) pour délivrer en sous-cutané chez l'Homme, sur plusieurs jours, semaines ou mois, différents principes actifs médicamenteux. L'objectif de cette nouvelle formulation est de limiter les variations importantes de la concentration sanguine du principe actif médicamenteux, afin de réduire très significativement les risques d'effets secondaires, et d'assurer une meilleure prise médicamenteuse. Il s'agit d'injecter sous la peau une solution à base de polymères biodégradables renfermant le médicament d'intérêt. Cette solution, une fois en sous-cutané, va se figer, et libérera progressivement la substance active médicamenteuse tout en se dégradant en parallèle. En fonction de la composition en polymères, le dépôt libérera plus ou moins longtemps et rapidement la substance active médicamenteuse. Le but de cette étude expérimentale est d'évaluer si l'échographie haute résolution, imagerie non-invasive utilisée quotidiennement chez l'Homme, permet de localiser le dépôt polymérique, et de mesurer la variation de son volume au fil du temps. Les données de cette étude permettront d'envisager :

- si oui ou non l'échographie pourra être envisagée dans le suivi clinique de l'injection de solution de polymères au cas où un surdosage médicamenteux ou une allergie, afin de localiser et de bien délimiter le dépôt polymérique à des fins d'exercice ;

- le suivi de différentes formulations de polymères avec leur cinétique de bio-résorption.

Cette étude portera sur 14 rats mâles adultes répartis en deux groupes (volumes injectés différents). Ce modèle a été choisi car il est possible chez le rat d'utiliser le même type de sonde échographique que chez l'Homme. Pour se rapprocher encore davantage des conditions cliniques, les animaux seront des mâles car plus gros et avec une peau plus épaisse. Il s'agit d'un excellent compromis entre la taille de l'animal, le volume de solution polymérique injectée et la sonde échographique utilisée chez l'animal et utilisable chez l'Homme. Après une période d'acclimatation, chaque rat recevra une injection sous cutanée. En plus d'un suivi clinique quotidien, un suivi par échographie sera réalisé au moment de l'injection, à 24 et 48 heures, puis à J7, J14, J21 et J28. Trois rats de chaque groupe seront mis à mort après la mesure à 48h, et la zone d'injection sera prélevée. Les 4 rats restants de chaque groupe seront imagés jusqu'à J28 puis mis à mort et prélevés.

Des études de pharmacocinétique et de toxicologie réglementaires ont été réalisées, et n'ont pas mis en évidence d'effets généraux ou locaux de la solution polymérique.

Finalement l'option de suivre la dégradation du composé par imagerie échographique apparaît donc comme une stratégie adaptée au respect de la règle des 3 R de l'éthique dans l'expérimentation animale (Remplacer, Réduire, Raffiner). Cette technologie permet notamment de réduire considérablement le nombre des animaux utilisés (suivi longitudinal sans mise à mort) et de raffiner les protocoles : Les animaux seront hébergés deux par cage pour éviter le stress de solitude avec un enrichissement environnemental.

6181. Les canaux potassium participent au contrôle de l'activité électrique des cellules excitables et non excitables. Un de ces canaux, appelé TWIK1, peut devenir moins sélectif pour le potassium et laisser passer des ions sodium. TWIK1 devient alors un

canal excitateur et non plus inhibiteur. Compte tenu des implications possibles de ce canal dans des pathologies humaines, notamment l'hypertension, il est important d'évaluer *in vivo* les conséquences de cette sélectivité dynamique de TWIK1.

Des données génétiques montrent toute l'importance de la sélectivité pour le potassium des canaux exprimés dans la glande surrénale. Des pertes de sélectivité d'un canal potassique sont en effet responsables de 30 % des adénomes de Conn, conduisant à l'hyperaldostéronisme primaire, une forme fréquente d'hypertension résistante aux traitements classiques. TWIK1 est fortement exprimé dans le cortex de la glande surrénale qui sécrète une hormone, l'aldostérone, essentielle pour la régulation de la pression artérielle. La participation de TWIK1 dans le contrôle de la sécrétion de cette hormone n'a pas encore été évaluée. Nos données préliminaires indiquent une surexpression de TWIK1 dans les adénomes de Conn humains, suggérant un rôle du canal dans cette forme d'hypertension chez l'homme. TWIK1 est également abondamment exprimé dans le rein où il intervient dans la régulation des transports d'ions tout au long du néphron et donc dans la régulation de la pression artérielle qui dépend de la diurèse. Enfin, TWIK1 est exprimé dans les cellules  $\beta$  du pancréas où il intervient dans la régulation de la sécrétion d'insuline, avec pour conséquence une association entre la fonction de TWIK1 et le diabète de type 2.

Nous comparerons les fonctions rénales, pancréatiques et surrénaliennes des trois modèles de souris génétiquement modifiées entre elles ainsi qu'avec les souris sauvages.

Remplacement : nous avons d'ores et déjà élucidé les mécanismes *in vitro* qui sous-tendent notre hypothèse. Nous avons besoin de les valider dans un organisme entier tel que la souris car pour le moment, aucun système *in vitro* ne nous permet de reproduire l'ensemble des mécanismes physiologiques d'un organisme entier.

De par ses similarités avec la physiologie humaine et parce ce que nous possédons plusieurs modèles génétiquement modifiés pour TWIK1, la souris constitue le meilleur modèle pour adresser nos questions dans une perspective préclinique.

Réduction: nous avons effectué une large recherche bibliographique afin de nous assurer de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés. Cette recherche bibliographique nous a permis d'optimiser nos procédures et le nombre d'animaux à utiliser afin d'obtenir une réponse statistiquement significative.

Raffinement : afin d'éviter toute souffrance ou angoisse aux animaux, nous mettrons en œuvre tous les éléments de raffinement nécessaires, notamment anesthésie/analgésie lorsque cela est requis. Nous nous servons de fiches de suivis incluant des grilles de scores. Ces grilles de scores contiennent des points limites précis, clairs et adaptés à nos expérimentations. La mort n'étant pas un point limite acceptable, nous sortirons les souris de l'étude lorsqu'un des points limites sera atteint.

Nous utiliserons au total 1138 souris sur 5 ans, réparties en 569 mâles et 569 femelles.

6182. Le CA3 est une région du cerveau impliquée dans la mémoire et l'apprentissage. Située dans une région profonde du cerveau, l'homme et la souris partagent, pour une grande partie, les mêmes caractéristiques. Dans la maladie d'Alzheimer ou dans l'épilepsie, le CA3 fonctionne anormalement. Les cellules du cerveau dans la région CA3 sont connectées dans un circuit spécialisé unique, mais une grande partie des informations sur ce circuit est inconnue. On ne sait pas non plus précisément comment ce réseau de cellules cérébrales permet la formation des mémoires. Nous allons étudier la façon dont ce circuit est configuré dans des souris sauvages.

Une méthode puissante d'observation de l'activité des réseaux de cellules du cerveau utilise un outil appelé "les indicateurs calciques codés génétiquement". Cette technique utilise des virus pour fournir des informations génétiques aux cellules cérébrales spécifiques qui nous intéressent. Les cellules sont alors en mesure d'utiliser cette information pour faire un produit chimique qui s'allume quand elles sont actives. Les tranches de cerveau prises à partir de ces animaux peuvent ensuite être observées avec un microscope spécialisé pour mesurer l'activité des cellules et comprendre comment elles sont connectées dans un réseau.

Cela nous permettra de connaître la structure et la fonction de la région CA3, ce qui permettra des recherches futures sur les différences observées dans la région du CA3 lors de maladies telles qu'Alzheimer et dans l'épilepsie.

Dans ce projet, nous utiliserons un nombre total de 479 souris.

Dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) les mesures suivantes seront prises: (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 du réseau de neurones. (2) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles d'électrophysiologie et 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).

6183. Le médulloblastome est une des tumeurs pédiatriques les plus fréquentes et agressives. Le taux de guérison est d'environ 70% mais les traitements associant radiothérapie et chimiothérapie sont excessivement délabrant. De plus, les rechutes sont malheureusement fatales dans la majorité des cas. Aucun traitement conventionnel (radiothérapie et chimiothérapie associées) ou alternatif (ciblant les systèmes vasculaire ou immunitaire, ou encore la réponse inflammatoire) n'est efficace contre ces cancers lors des rechutes. Ceci est dû à : (i) une forte hétérogénéité de la pathologie (4 groupes décrits dont le pronostic vital associé est variable), caractérisée par l'activation de voies de signalisation spécifiques et (ii) une forte propension à développer des résistances aux traitements de référence, induisant la récurrence post-thérapeutique de la maladie. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes de cette résistance pour (i) identifier des marqueurs biologiques de cet échappement thérapeutique, (ii) adapter le traitement et/ou développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les facteurs impliqués dans la progression.

Nos études réalisées *in vitro* sur plusieurs types de tumeurs, parmi lesquels plusieurs modèles de médulloblastomes, montrent l'implication de deux types de facteurs de croissance, le VEGF-C (facteur de croissance des vaisseaux lymphatiques) et les cytokines de la famille ELR+CXCL (cytokines pro-angiogéniques), dans les phénomènes de progression tumorale sous traitement.

La procédure 1 a pour but de tester plusieurs catégories d'agents anti-tumoraux (antiangiogéniques, agents chimiothérapeutiques de nouvelle génération, protonthérapie, etc.), afin de pallier la résistance que développent les médulloblastomes – notamment les plus sévères d'entre eux – aux traitements de référence. En cas de réponse positive *in vivo*, ces nouveaux modes de traitement pourraient être envisagés comme complémentaires aux traitements actuels, pour traiter les patients devenus résistants au traitement de première intention. Dans cette procédure, nous caractériserons les mécanismes de résistance des médulloblastomes au traitement par radiothérapie ou chimiothérapie et, plus précisément, l'implication du VEGF-C et des cytokines pro-angiogéniques de la famille ELR+CXCL dans ces mécanismes.

Les marqueurs moléculaires mis en évidence pourront être utilisés à des fins pronostiques (indicateurs de la sévérité de la pathologie) ou prédictives (marqueurs de la résistance aux traitements). Ils devraient également constituer une base de travail pour le développement d'une nouvelle génération d'agents thérapeutiques (traitements personnalisés). Cette stratégie devrait permettre une meilleure prise en charge des cas évolutifs mais aussi, une amélioration de la qualité de vie post-thérapie, en limitant l'agressivité des traitements.

La procédure 2 vise à étudier l'influence du microenvironnement tumoral sur la croissance de la tumeur et sur le développement de l'agressivité tumorale, « quantifiée » par l'apparition de marqueurs d'angiogenèse ou de lymphangiogenèse. Le but de la procédure est de permettre le développement d'une tumeur dans son environnement habituel, par une greffe de cellules tumorales de souris au cœur même du cervelet de la même espèce. Nous serons donc en mesure de tester *in vivo* les effets de plusieurs traitements chimiothérapeutiques.

La procédure 3, enfin, nous permettra d'établir le lien entre nos études fondamentales, nos études chez la souris utilisant des modèles cellulaires et une future étude chez le patient. Des coupes de tumeurs de patients obtenues après résection au moment du diagnostic seront traitées par la chimiothérapie de référence : étoposide (ou VEPESIDE™) couplé au carboplatine. Des fragments de tumeurs traitées et de tumeur contrôle seront greffées sous la peau de souris nude, afin de déterminer les capacités angiogéniques et lymphangiogéniques de ces tumeurs au moment du diagnostic et après traitement chimiothérapeutique.

Sur le plan éthique et conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences proposées sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences *in vitro* qui permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences *in vivo*. Une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite aux injections de cellules et traitements administrés. Si de tels signes devaient apparaître, les mesures nécessaires seraient prises grâce à l'application des points limites clairement définis. Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficieront d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dûment qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale.

En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études *in vivo* sont nécessaires et non contournables. Nous avons donc réduit à un minimum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude, dans le respect de la significativité statistique des résultats que nous en attendons.

Ainsi, nous utiliserons pour ce projet de trois années un total de 350 souris Nude.

Les souris Nude sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xéno greffes de cellules humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xéno greffes de cellules humaines. Ce modèle animal est couramment employé et a été beaucoup utilisé par l'équipe.

6184. Le projet s'inscrit dans le cadre de développement de vaccins et/ou de traitements antiviraux pour la lutte contre des maladies virales dues à des virus du genre Morbillivirus, affectant l'homme et les petits ruminants. Il consiste à établir l'efficacité de nouveaux vaccins et thérapeutiques antiviraux contre ces morbillivirus en utilisant des petits animaux de laboratoire et l'imagerie *in vivo* en lieu et place d'animaux d'espèces cibles. Le principe est basé sur le suivi dynamique chez le même animal de la décroissance virale lorsque l'on administre un vaccin ou un traitement antiviral. Pour ce faire, les virus d'intérêt sont modifiés pour exprimer un marqueur luminescent biologiquement neutre, repérable par imagerie *in vivo* sur animaux anesthésiés. Les relevés d'image peuvent être quotidiens sur les mêmes animaux, limitant le recours à des cohortes d'animaux sacrifiés à différents temps post-infection. Ainsi, un suivi quotidien sur 5 animaux pendant 10 jours équivaut à une série d'observations effectuées sur 50 animaux sacrifiés par groupe de 5 chaque jour. En cela, le projet satisfait aux exigences des 3 R (remplacement, réduction et raffinement). Un maximum de 720 souris sera utilisé dans le projet sur une période de 5 ans. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de leur hébergement. Pour réduire le stress, les souris seront hébergées en groupes et leur milieu enrichi par l'ajout de tunnels et/ou de carrés de cellulose.

6185. Les molécules anti-angiogéniques ont démontré un effet important en thérapie anti-tumorale. Cependant, ces traitements ne sont pas efficaces sur tous les types de cancers.

Notre équipe travaille sur une molécule, CD146 soluble, qui est sécrétée par certaines cellules cancéreuses (pancréas, mélanome, sein, rein, ...) et qui possède des propriétés angiogéniques. Nous avons donc généré des anticorps spécifiques de CD146 soluble avec l'objectif de les utiliser comme molécules anti-angiogéniques dans les pathologies tumorales.

Les résultats obtenus *in vitro* montrent que ces anticorps anti-CD146 soluble pourraient avoir un réel intérêt thérapeutique en bloquant les effets angiogénique, métastatique et anti-apoptotique de la molécule CD146 soluble. Toutefois, il reste à démontrer ses effets sur des modèles animaux de tumeur. Notre programme consiste à tester l'effet de la molécule CD146 soluble et de l'anticorps anti-CD146 soluble, en comparaison avec le bevacizumab. Pour cela, les différents types de cellules cancéreuses seront xéno greffées soit chez des souris nude, soit chez des souris NOD/SCID en fonction de l'efficacité de la prise de greffe. Nous étudierons les effets de la molécule et des anticorps sur l'angiogenèse et la croissance tumorale mais aussi sur l'apoptose et la dissémination métastatique.

Nous utiliserons un total de 320 souris nude pour réaliser les xénogreffes de tumeurs du pancréas, du colon et de mélanome. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R- Remplacement/Réduction/ Raffinement » sera appliquée. Le protocole sera arrêté si l'animal présente un mauvais état de santé ou si la tumeur devient trop importante. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal grâce à une grille d'évaluation de la douleur. Enfin, les animaux seront hébergés dans une animalerie conventionnelle et un enrichissement adapté sera donné afin de veiller au bien-être des animaux.

6186. La recherche de nouveaux composés antidiabétiques est capitale afin d'endiguer les effets délétères et la morbidité associée à la pathologie diabétique dont la prévalence ne cesse d'augmenter depuis plus de 30 ans. C'est aussi un enjeu de santé publique majeur tant les dépenses de santé associées au diabète sont grandissantes

Il y a quelques années, nous avons identifié un produit pharmacologique efficace pour améliorer l'insulinorésistance dans un modèle de souris sous régime hyper gras. Seulement, le mode d'action de ce composé, efficace également en clinique (actuellement en fin de phase clinique 2b), n'est toujours pas connu avec précision. Ce manque de compréhension sur son mode d'action, constitue un frein potentiel à sa commercialisation. Ainsi, il nous appartient de décrypter avec précision le mécanisme d'action de ce nouveau composé dans des modèles plus simples d'étude préclinique ou d'études in vitro.

Le projet vise à tester sur culture d'hépatocytes primaires de rat, les capacités d'un nouvel antidiabétique oral à réduire la production de glucose dans des conditions de substrats très particulières. Plus largement, il vise à comprendre précisément le mécanisme d'action antidiabétique de ce nouveau produit afin d'apporter des preuves de concept claires de son efficacité et ainsi développer les phases cliniques du produit pour à terme en faire un nouveau médicament.

Pour cela, des hépatocytes de rats seront préparés et mis en culture. Après traitement des cellules par le composé, des tests de production de glucose seront réalisés à partir de différents substrats (Lactate, pyruvate etc..).

Aussi des études de fractionnement cellulaire seront réalisées sur ces mêmes cultures pour déterminer si le produit pénètre dans les différents compartiments cellulaires.

Nous avons pris en compte la règle des 3 R car ces expérimentations sont faites avec soucis de remplacer l'expérimentation animale, ici par une mise en cultures des cellules permettant de tester plusieurs conditions sur les cellules d'un même animal (au lieu de traiter l'animal). Nous réduisons également le nombre d'expérience en multipliant les tests sur une même préparation de cellules à partir d'un seul animal. Nous raffinons aussi l'expérimentation grâce à la même stratégie à savoir une multitude d'analyses sur une même préparation avec des cellules traitées et non traitées ce qui renforce, raffine les tests statistiques (appariés) et la puissance des résultats.

Le nombre d'animaux a été évalué à partir d'un test statistique tenant compte de la variabilité des précédentes expériences déjà effectuées dans exactement les mêmes conditions et la puissance de l'effet anticipé du produit (30% d'inhibition). Nous arrivons à un nombre de 8 cultures d'hépatocytes pour la production de glucose et de 6 cultures pour la détermination de la présence du produit dans les fractions cellulaires. Pour chaque animal, la totalité des hépatocytes collectés (environ 250 millions) seront utilisés. Ils permettent à chaque isolement, de réaliser l'ensemble des tests de production de glucose avec les différents substrats à tester. Avec les mises au points d'expérimentations et les quelques échecs d'extractions d'hépatocytes à prévoir malgré l'expérience des expérimentateurs, nous prévoyons d'utiliser 20 animaux.

D'autres organes dont les muscles des animaux seront mis à disposition d'autres membres du laboratoire pour des extractions de mitochondries et des tests sur celles-ci.

L'hébergement des animaux se fait avec milieu de vie enrichi et une observation quotidienne.

6187. Les muscles squelettiques sont essentiels pour le maintien de la posture, la mise en mouvement du squelette, la respiration, la régulation du métabolisme. Le corps humain comprend plus de 600 muscles squelettiques dont la taille varie selon leur fonction. Les muscles striés squelettiques constituent le plus grand organe du corps humain (environ 40% à 50% de la masse corporelle d'un individu sain) et il est le plus grand consommateur d'éléments nutritifs.

L'état du tissu musculaire est un facteur crucial dans les maladies cardiovasculaires, le cancer avec la cachexie cancéreuse, le diabète, l'obésité ainsi que l'ensemble des myopathies. La fonction du muscle squelettique est également l'un des principaux facteurs néfastes pour la longévité et la qualité de vie des personnes âgées. De plus, elle peut être une source majeure de handicap moteur et est accompagnée par une augmentation des risques de chutes, de perte d'autonomie, d'institutionnalisation et de mortalité.

Au cours du vieillissement, la perte progressive de la masse musculaire squelettique est référencée sous le terme sarcopénie, laquelle est également associée à des troubles cardiovasculaires, métaboliques et cognitifs. Dans le système neuromusculaire, la sarcopénie est également liée à l'altération des jonctions neuromusculaires (JNM) qui entraîne une perte de communication entre le muscle et les neurones moteurs. L'ensemble se traduit par une incapacité du muscle à fonctionner, aboutissant au niveau moléculaire à une dérégulation de l'expression génique et de l'organisation de la chromatine.

Nous voulons développer des modèles de souris génétiquement modifiés afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation épigénétique ayant lieu dans les cellules post-mitotiques et le maintien de l'homéostasie musculaire au cours du vieillissement. Le modèle souris est devenu un modèle de choix dans la recherche génétique sur les mammifères en raison de ces étroites similitudes génétiques et physiologiques avec les humains, et à la facilité avec laquelle son génome peut être manipulé et analysé. De récents travaux ont établi la souris comme un excellent modèle de vieillissement humain. Elle se révèle être un système idéal pour étudier le rôle de gènes sur le plan physiologique et moléculaire et permettre d'identifier et proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Remplacement : Des expériences sur lignées cellulaires seront réalisées quand cela sera possible. Cependant le modèle murin reste l'unique moyen d'une part pour étudier fonctionnellement le muscle dans son entité au cours du vieillissement et d'autre part pour évaluer l'impact des défauts musculaires au niveau de l'organisme.

Réduction : Un nombre minimal mais suffisant d'animaux sera utilisé pour permettre d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. 1332 souris.

Raffinement : Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux tout au long du protocole. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée par l'expérimentateur pour déterminer et s'assurer de la prise en compte de points limite.

6188. Notre projet a pour but de mieux comprendre l'influence des cellules immunitaires sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pendant le traitement chimiothérapeutique et radiothérapeutique dans les modèles murins de tumeur. Pour cela, nous évaluerons différents paramètres immunitaires et vasculaires suite à l'application de différents traitements agissant sur la croissance tumorale. Des études réalisées chez l'homme et la souris ont révélé que l'irradiation thérapeutique et la chimiothérapie sont des outils importants pour le traitement de tumeurs malignes. Le succès d'une thérapie du cancer dépend, entre autres, de la structure vasculaire de la tumeur, et de son débit sanguin. Il est généralement admis que parmi les cellules immunitaires dans les tumeurs, les cellules myéloïdes favorisent la résistance à la thérapie des tumeurs malignes. Leurs effets pro-tumoraux pourraient également être dus à leurs actions sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pendant la croissance tumorale. Cette proposition est largement appuyée par le fait que certaines cellules immunitaires expriment fortement des facteurs de croissance des vaisseaux. Seule l'expérimentation *in vivo*, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement tumoral, permettra de répondre à cette proposition. La souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le développement tumoral, la réponse immunitaire et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. 2 traitements agissant sur la croissance tumorale, l'irradiation thérapeutique et la chimiothérapie, seront appliqués à 4 groupes de souris. Après inoculation des cellules tumorales, la croissance des tumeurs sera suivie quotidiennement et comparée entre les différents groupes. Pour évaluer l'action des traitements appliqués nous utiliserons des tests statistiques non-paramétriques aux différentes dates. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 576 souris. Les différentes procédures expérimentales, comme l'inoculation des tumeurs et leurs traitements, ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants : certains paramètres expérimentaux, tels que le type cellulaire et le nombre de cellules nécessaires à l'implantation, ont déjà été déterminés par d'autres projets et permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés. D'autres études concernant l'influence des cellules immunitaires sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ont auparavant été réalisées *in vitro*. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Au score clinique est adjointe une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet, évaluant l'état général de l'animal, la perte de poids, l'apparence et le comportement de l'animal, révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal. A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans la régulation de la tumorigenèse et de la résistance à la thérapie des tumeurs. Ils permettront de renforcer ou infirmer l'idée selon laquelle l'utilisation de thérapeutiques agissant sur les médiateurs de la réponse immunitaire et de la croissance tumorale pourrait avoir un effet bénéfique chez des patients atteints d'un cancer

6189. L'arthrose est une maladie de l'ensemble de l'articulation détruisant le cartilage et changeant l'os situé juste en dessous. Ces changements de l'os se traduisent entre autres par la formation d'os autour de l'articulation arthrosique : c'est l'ostéophyte. D'après certains auteurs il serait responsable de la douleur associée à la maladie. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la formation de l'ostéophyte, pourrait apporter de nouvelles cibles pour les traitements.

La protéine Lin28a a pour fonction la destruction de certains microARN (MiRNA) qui empêchent la synthèse de certaines protéines. La fonction de LIN28a serait de maintenir les cellules dans un état non spécialisé et de favoriser la multiplication cellulaire. LIN28a est fortement exprimé dans les tissus en développement notamment dans les os long, mais son expression disparaît par la suite. Cependant des études effectuées sur des prélèvements de cartilage humain et sur des coupes de genoux de souris arthrosiques (suite à l'ablation du ménisque) semblent montrer que cette protéine serait ré-exprimée dans le cartilage arthrosique notamment dans la zone où prendra naissance l'ostéophyte (le nœud de Renvier). De plus des expériences *in vitro* montrent que l'on peut moduler l'expression de LIN28a dans les chondrocytes. Notre hypothèse est qu'au cours de l'arthrose Lin28a s'allume et induit un changement dans les cellules du cartilage qui prolifèrent et qui perdent de leur spécialisation de cellules du cartilage pour former de l'os nouveau. Les modèles cellulaires sont incomplets pour ce qui est d'étudier le développement de l'arthrose et notamment la formation de l'ostéophyte. A ce jour, seules les données obtenues *in vivo* permettent d'intégrer l'ensemble des paramètres de la maladie.

Nous nous proposons d'étudier l'effet de la protéine Lin28a dans le cartilage articulaire sur la formation ostéophyttaire et la dégradation du cartilage. C'est pour cela que nous proposons d'annuler l'expression de cette protéine dans le cartilage *in vivo*, dans le but d'analyser sa fonction potentielle dans le développement de l'arthrose. L'extinction totale de Lin28a dans toute la souris, pourrait entraîner des modifications durant le développement qui rendraient toutes analyses chez l'adulte très difficiles à interpréter. Pour éviter cela, nous disposons de souris génétiquement modifiées dont la protéine Lin28a est absente du cartilage uniquement, et seulement après injection d'un composé chimique (le Tamoxifène). Les souris exprimant Lin28a, générées lors des croisements, seront utilisées comme souris contrôles.

Le rôle de l'extinction de Lin28a sera testé sur un modèle d'arthrose induite chez des mâles âgés de 10 semaines (ce qui correspond à la fin de la croissance) par déstabilisation de l'articulation provoquée par ménissectomie. Toutes les souris recevront du tamoxifène (1g/kg de souris) en intra péritonéale pendant les cinq jours qui précèdent la ménissectomie pour induire l'extinction de Lin28a. Les effets sur les cellules induits par l'opération sont extrêmement précoces (de 3 jours à une semaine), alors que l'impact sur les tissus est plus tardif (8 semaines). Il est donc nécessaire de faire des observations à chacun de ces points. L'euthanasie sera réalisée à 3 jours, 1 semaine, 4 semaines et 8 semaines, après ménissectomie. Pour se faire nous aurons besoin 120 animaux (15 animaux sans

perte de Lin28a et 15 animaux avec perte de l'expression du gène pour chacun des 4 temps). Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux sans compromettre les résultats, nous pratiquerons la ménissectomie sur un seul des genoux de la souris, l'autre servant de contrôle. L'animal sera ainsi son propre témoin.

Chaque souris, recevra deux injections de Buprenorphine, (molécule opiacée) permettant le traitement de la douleur, la première sera faite 15 mn avant chaque intervention chirurgicale, la seconde six heures plus tard. L'acte chirurgical sera pratiqué sous anesthésie générale, par injection intra péritonéale, (Kétamine et Xylazine). Durant l'hébergement (8 semaines maximum) les souris seront 5 par cage, enrichie de matériel pour la nidification. Les souris seront observées 3 fois par semaine pour rechercher tous les signes de souffrance, tels que : modification du comportement, poils hérissés et ternes, hypoactivité, prostration, vocalismes et boitement. Si un de ces signes est observé l'animal en question fera l'objet de dispositions particulières (mesure du poids, injection d'un antalgique par voie sous cutanée, mise en place de nourriture plus accessible sous forme de gelée enrichie). Si ces signes persistent et/ou que l'animal perd 20% de son poids malgré les traitements antalgiques l'animal sera alors retiré de l'expérimentation et euthanasiés.

6190. La toxoplasmose, est une infection bénigne peu ou pas symptomatique dans plus de 80% des cas causée par un protozoaire cosmopolite, intra cellulaire obligatoire : *Toxoplasma gondii*. La forme tachyzoïte répliquative du parasite infecte et se multiplie dans toutes les cellules nucléées de son hôte (tous les vertébrés). L'infection persistera durant toute la vie de l'hôte à l'état de latence sous forme de kystes contenant des bradyzoïtes avec un tropisme particulier pour le système nerveux central (SNC). En France, la prévalence est d'environ 40%.

L'infection peut être responsable d'une toxoplasmose congénitale si elle survient pendant la grossesse chez une femme non immunisée et peut également entraîner des formes sévères, rapidement mortelles en l'absence de traitement chez les sujets immunodéprimés (VIH ou greffés), en phase aiguë ou au cours d'une réactivation d'une infection chronique. Trois principaux génotypes de *T. gondii* sont identifiés ; tous peuvent infecter l'Homme, mais une large prédominance du génotype II est observée en France métropolitaine. Certains génotypes très virulents circulent en Amérique du Sud et en Guyane. Des études ont montré l'existence de gènes de résistance dont ROP18 conférant aux souches non virulentes de type II mutées, une virulence proche de souche de type I virulentes.

Le tropisme et la latence du parasite dans le SNC sont associés à des modifications physiologiques et comportementales chez l'animal, et ont été suspectés de jouer un rôle dans la survenue de pathologies impliquant le cerveau (Schizophrénie, trouble obsessionnels compulsifs (TOC) ou encore modification du comportement. De plus il a récemment été montré que la phase d'invasion parasitaire était associée à des modifications du microbiote intestinal.

Le microbiote intestinal est aujourd'hui considéré comme un organe à part entière. En effet, il est maintenant bien établi que celui-ci joue un rôle primordial dans différentes fonctions de notre organisme. Ainsi, des modifications de ce microbiote (dysbioses) ont été associées à diverses pathologies, qu'elles soient intestinales ou non. Le microbiote intestinal est notamment suspecté d'être impliqué dans la survenue de maladies touchant le cerveau telles que l'autisme ou la schizophrénie. Ainsi, ces dysbioses pourraient avoir des répercussions au niveau central via l'axe cerveau/intestin. Les modifications de comportement seront étudiées sur une période de 24h, une fois par semaine dans des cages type Phenotyper.

L'objectif de cette étude est d'observer les effets indirects d'une infection chronique sur le microbiote intestinal et sur le comportement des animaux et de mettre en évidence un éventuel rôle de la virulence de la souche de parasite sur les modifications observées.

Ce projet est conforme aux exigences éthiques en matière d'expérimentation animale. En effet, (1) le recours à l'animal est indispensable puisqu'il n'existe pas d'alternative pour réaliser ces expériences. (2) Les expérimentations sont organisées de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables avec le plus petit nombre d'animaux possible (72 souris au total). (3) Les expérimentations et la méthodologie sont optimisées afin de réduire l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subies par les animaux (soin porté à l'amélioration des conditions d'élevage et d'hébergement, enrichissement du milieu pour les animaux en bas âge). De plus, les modèles animaux sont choisis avec pertinence afin de répondre à la problématique posée.

6191. Les cellules souches pluripotentes sont des cellules capables de donner tous les tissus qui constituent un organisme adulte. Chez l'homme, ces cellules présentent un grand espoir pour le développement de nouvelles techniques thérapeutiques par remplacement cellulaire. Chez la souris, ces cellules sont utilisées en routine pour créer des lignées de souris transgéniques permettant la compréhension de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques. Chez les autres mammifères, ces cellules présentent aussi un grand intérêt pour la création d'animaux transgéniques modèles de maladies humaines ou pour la production d'animaux bioréacteurs, c'est-à-dire producteurs de molécules thérapeutiques dans leur lait. Cependant, jusqu'à présent, aucune lignée de cellules souches pluripotentes capables de coloniser un embryon receveur et donc de créer des animaux transgéniques n'a pu être obtenue chez d'autres espèces que la souris. Notre projet vise donc à étudier les mécanismes qui permettent aux cellules souches pluripotentes de coloniser un embryon receveur en utilisant comme espèce modèle le lapin. L'utilisation de l'espèce lapin présente un triple intérêt : (i) du point de vue fondamental, bien que différentes des cellules de souris, les cellules souches pluripotentes de lapin présentent les mêmes caractéristiques que celles des autres mammifères ; (ii) du point de vue appliqué, le lapin est un très bon modèle de certaines maladies humaines impliquant le système cardiovasculaire, lipidique ou immunitaire ; et (iii) du point de vue pratique, le lapin est un petit animal prolifique possédant des temps gestationnels et générationnels courts. Notre projet est donc un projet fondamental qui vise à comprendre des mécanismes cellulaires mais qui devrait aboutir à des applications concrètes aussi bien chez le lapin que chez d'autres mammifères, en permettant l'utilisation des cellules souches pluripotentes comme outils biotechnologiques performants pour la création de modèles animaux de maladies humaines.

Pour développer ce projet de recherche, nous allons réaliser toutes les analyses et étapes possibles en culture de cellules, mais nous aurons besoin au total de 1917 animaux pour trois procédures : (i) la production d'embryons à différents stades de développement car les cellules souches pluripotentes sont obtenues à partir d'embryons : nous utiliserons des lapines stimulées au niveau ovarien pour obtenir 3 à 4 fois plus d'embryon par lapine; (ii) la gestation d'embryons manipulés en culture avant leur transplantation chez des lapines porteuses : nous étudierons les embryons tout d'abord *in vitro* avant de passer à l'étape *in vivo* pour réduire le nombre de lapines utilisées; et (iii) la création de lapins transgéniques marqueurs ou inducteurs de pluripotence grâce à des techniques de micro-injection dans des cellules œufs d'un transgène (un gène marqueur fluorescent ou un gène activateur de pluripotence) : nous utiliserons trois types de vecteur pour optimiser l'insertion du transgène selon le but recherché et limiter au maximum le nombre de lapines employées. Les lapines donneuses d'embryon seront des lapines de réforme, c'est-à-dire des lapines qui ont déjà eu plusieurs mises-bas. Les animaux seront hébergés dans des cages individuelles pour les mâles ou collectives de 2 à 4 animaux pour les femelles, comportant un ou deux perchoirs, du foin et des bâtons à ronger, avec un accès illimité à l'eau et une dose adaptée de nourriture, ainsi qu'un cycle lumineux jour/nuits de 12h/12h. Ils seront surveillés tous les jours par des animaliers qualifiés. Certaines lapines subiront une opération chirurgicale pour le transfert d'embryons dont la sévérité est modérée. Dans ce cas, un suivi post-opératoire bi-journalier sera réalisé par les animaliers et une fiche individuelle de suivi de la douleur sera établie. Cinq jours avant la fin de la gestation qui dure entre 31 et 33 jours, les lapines seront séparées en cage individuelle et un nid adapté et des copeaux de bois seront placés dans les cages pour qu'elles puissent préparer leur mise-bas et l'allaitement de leurs petits. Les lapereaux issus des procédures de transgénèse seront triés grâce à une analyse génétique réalisée à partir d'une biopsie de queue dont la sévérité est légère. Les lapins qui s'avèreront être négatifs seront réutilisés dans les procédures de production ou de gestation d'embryons afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Les lapins positifs (15 mâles) seront élevés comme fondateurs des lignées transgéniques et ne subiront que des prélèvements de sang ou des biopsies de peau dont la sévérité est légère. De plus, les transgènes utilisés seront soit inoffensifs pour l'animal (gènes marqueurs de pluripotence) car ils produisent une molécule fluorescente sans action néfaste sur la physiologie, soit inactivés par un système biologique spécifique, levé uniquement par l'ajout d'une drogue utilisée seulement sur des embryons ou des cellules en culture (gènes inducteurs de pluripotence), car leur action peut entraîner des phénomènes de cancérisation. Dans ce dernier cas malgré l'absence d'activation de ce transgène, les lapereaux issus de ces procédures de transgénèse seront particulièrement surveillés pour repérer toute apparition de tumeur ou tout comportement anormal signalant une pathologie ou une souffrance, et mis à mort si besoin.

6192. La transplantation d'îlots de Langerhans est la principale technique de thérapie cellulaire du diabète de type 1 actuellement disponible. Cette technique, consistant à transplanter aux patients diabétiques de type 1 des îlots de Langerhans capables de sécréter de l'insuline, offre la possibilité d'un arrêt de toute injection d'insuline.

Si le bénéfice de la transplantation d'îlots est désormais démontré chez les patients diabétiques type 1 porteurs de diabète instable, le nécessaire recours aux traitements immunosuppresseurs lourds d'effets indésirables (risques infectieux et risques de cancers à long terme) s'oppose à la généralisation de la transplantation d'îlots à l'ensemble des patients diabétiques de type 1.

L'avenir de la technique et la généralisation de la technique au plus grand nombre doivent passer par un arrêt du recours aux traitements immunosuppresseurs. Parmi les stratégies envisagées pour permettre un arrêt du recours aux traitements immunosuppresseurs, l'encapsulation d'îlots est extrêmement prometteuse : la micro-encapsulation est basée sur l'incorporation des îlots pancréatiques au sein de billes de biomatériaux (alginate). Cette barrière mécanique assure une protection des îlots contre le système immunitaire en l'absence de traitements immunosuppresseurs.

Dans ce contexte, un consortium d'équipes de recherche internationales et d'industriels vient d'obtenir, dans le cadre du programme européen Horizon 2020, le financement d'un projet (8 millions d'euros). Ce projet vise à la mise au point de bio-capsules complexes implantables destinés à transplanter des patients diabétiques de types 1 sans recours à aucun traitement immunosuppresseur.

Dans un souci de respect de la règle des 3R, nous avons:

Remplacé : cette étape intermédiaire est essentielle avant la greffe d'îlots pancréatiques encapsulés chez l'Homme.

Réduit au minimum le nombre d'animaux, nous prévoyons l'usage de 65 rats pour effectuer 5 groupes de 13 rats pour atteindre la puissance statistique.

Raffiné en améliorant l'hébergement des animaux avec milieu de vie enrichi, observation quotidienne par l'équipe responsable de l'animalerie (comportement, aspect, détection de toute souffrance) de façon à apporter les moyens antalgiques nécessaires.

6193. La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très fréquente et invalidante et représente donc un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations chez les patients, avec une érosion osseuse et une déformation irréversible des articulations.

Il existe plusieurs stratégies de traitement de cette pathologie, mais aucune ne permet une stabilisation complète à long terme et encore moins une rémission. De nombreux travaux ont permis l'émergence de biothérapies basées sur l'inhibition de certaines voies d'inflammation (anti-TNFs, anti-IL17, ...). Il existe actuellement plusieurs pistes de recherche pour tenter de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pouvant prendre le relais ou remplacer les traitements actuels, en échec dans un nombre important de cas. Un projet précédent a permis de mettre au point une nanoparticule nouvelle et efficace contre cette pathologie. Le présent projet vise à valider cette particule en vue d'un essai clinique pour remplacer ou seconder les médicaments actuels. Nous devons établir le mécanisme d'action et contrôler que la version clinique développée actuellement présente bien les mêmes propriétés que la version préclinique précédemment évaluée.

Cette étude comprend deux phases : I/ évaluation des formulations et détermination de la formulation optimale ainsi que ses modes d'administration et II/ Etude par imagerie de la bio-distribution des liposomes, de leur modes d'action et détermination de paramètres

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

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

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

Les procédures d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux lors des manipulations. Au total 688 souris seront utilisées dans ce projet.

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

6194. La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très fréquente et invalidante et représente donc un enjeu de santé publique. Cette pathologie auto-immune induit une inflammation chronique des articulations chez les patients, avec une érosion osseuse et une déformation irréversible des articulations.

Il existe plusieurs stratégies de traitement de cette pathologie, mais aucune ne permet une stabilisation complète à long terme et encore moins une rémission. De nombreux travaux ont permis l'émergence de biothérapies basées sur l'inhibition de certaines voies d'inflammation (anti-TNFs, anti-IL17, ...). Il existe actuellement plusieurs pistes de recherche pour tenter de trouver de nouvelles approches thérapeutiques pouvant prendre le relais ou remplacer les traitements actuels, en échec dans un nombre important de cas. Un projet précédent a permis de mettre au point une nanoparticule nouvelle et efficace contre cette pathologie. Le présent projet vise à valider cette particule en vue d'un essai clinique pour remplacer ou seconder les médicaments actuels. Nous devons établir le mécanisme d'action et contrôler que la version clinique développée actuellement présente bien les mêmes propriétés que la version préclinique précédemment évaluée.

Cette étude comprend deux phases : I/ évaluation des formulations et détermination de la formulation optimale ainsi que ses modes d'administration et II/ Etude par imagerie de la bio-distribution des liposomes, de leur modes d'action et détermination de paramètres d'imagerie pour l'évaluation précoce des effets thérapeutiques. La phase I comporte deux parties : 1/confirmation des effets préventifs du traitement, et 2/ évaluation des possibles effets curatifs.

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

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

Les procédures d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance aux animaux lors des manipulations. Au total 688 souris seront utilisées dans ce projet.

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

6195. Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. L'une des hypothèses est que le cerveau des migraineux est sensibilisé même lorsque le patient est en inter-crise (entre 2 crises de migraine).

Les modèles animaux utilisés actuellement ne prennent pas en compte cette sensibilisation préexistante à la crise. Nous voulons donc réaliser une étude pour valider un nouveau modèle animal plus proche de la réalité clinique, en sensibilisant les méninges par des injections répétées de substances inflammatoires (SI) à leur surface puis en testant les effets d'une injection en intraveineux de nitroglycérine (NTG) qui est un donneur de monoxyde d'azote, connu pour provoquer des migraines uniquement chez les patients déjà migraineux. Cette approche ne peut donc se faire sans animaux. Pour valider notre modèle, nous testerons le sumatriptan, médicament de référence pour le traitement de la crise de migraine.

Pour réaliser cette étude, nous aurons 4 groupes d'animaux: les animaux recevant des injections de liquide cébrospinal artificiel (aCSF) à la surface des méninges et de NTG en intra-veineuse (i.v, n=8), les animaux recevant des injections de SI à la surface des méninges et de NTG en i.v (n=8). Puis nous testerons les effets du sumatriptan avec les animaux recevant des injections de SI à la surface des méninges et de NTG en i.v. avec le solvant du sumatriptan (n=8), et les animaux recevant des injections de SI à la surface des méninges et de NTG en i.v. avec le sumatriptan (n=8).

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but, les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habituation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux chez qui il serait impossible de réaliser ces tests. Ce nombre tient également 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). Au total 32 rats seront utilisés dans ce projet. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

Avoir un modèle qui se rapproche le plus possible des conditions cliniques permettra par la suite de tester des substances pharmacologiques pour améliorer les traitements proposés aux patients migraineux.



6196. Le projet a pour objectif l'évaluation de l'activité des immuns-sérums produits sur animaux et destinés à être utilisés chez l'homme, selon les normes d'efficacité/activité, d'innocuité et de sécurité réglementaires. Les immuns-sérums sont utilisés pour le traitement de personnes exposés à des maladies comme la rage, le tétanos et à des venins. Ces immuns-sérums sont des « life saving products » c'est-à-dire permettant de sauver des vies.

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

Ce projet représente l'ensemble des essais menés systématiquement sur chaque lot de produits immuns-serums fabriqués. Suite à l'injection du mélange séroneutralisé les animaux peuvent présenter des signes cliniques. Dans certains cas des points limites spécifiques sont définis à partir desquels les animaux sont euthanasiés de façon anticipée. La prise en charge d'un animal présentant des signes cliniques de maladie non attendus est réalisée sous la responsabilité du vétérinaire désigné.

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

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 18 000 souris pour une durée de 5 ans.

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

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les consignes en vigueur promues par le Comité d'Éthique.

Remplacement : Ces tests sont en cours de remplacement progressif par des tests *in vitro* de type ELISA.

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

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

6197. Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence une association de végétaux présentant un effet positif sur la stéatose hépatique de souris diabétiques et de souris nourries avec un régime riche en graisse. Une purification du candidat végétal a été réalisée et cette nouvelle expérimentation propose ainsi de tester son effet sur la stéatose hépatique due à l'hyperphagie caractéristique de ce modèle mutant. D'autres paramètres secondaires seront évalués tels que le profil lipidique sérique, la glycémie et la sensibilité à l'insuline, l'inflammation systémique et hépatique et des marqueurs sériques de toxicité hépatique.

L'extrait purifié sera, dans la continuité de nos précédents travaux, incorporé à l'alimentation des animaux, sur une durée de 4 semaines.

Le projet inclut 4 groupes de 14 souris diabétiques, âgées de 8 semaines en début de protocole.

Le modèle de souris diabétiques développe une stéatose hépatique dès 7 à 8 semaines d'âge, et est donc particulièrement bien adapté à l'étude de cette pathologie. Le recours à un modèle *in vitro* n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme du diabète de type 2 sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement *in vivo*.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 14 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole. Un nombre maximal de 56 souris db/db seront utilisées pour ces travaux de recherche.

6198. Le projet s'inscrit dans le contexte global de la R&D de candidats médicaments analgésiques, plus précisément des candidats médicaments antagonistes du récepteur NMDA. Il est en effet suggéré que des antagonistes du récepteur NMDA comme la kétamine, en co-administration avec des opiacés, peuvent avoir un effet analgésique ou au moins diminuer la consommation de ces derniers.

Plus précisément, le projet concerne l'utilisation d'un modèle physiologique préclinique permettant la mesure d'efficacité de candidats médicaments d'antagonistes du récepteur NMDA en développement dans l'industrie pharmaceutique. Le modèle physiologique consiste à mesurer les contractions réflexes du biceps femoris en réponse à une série de stimulations nociceptives électriques du pied chez le rat anesthésié avec transsection de la moelle épinière au niveau thoraco-lombaire. L'ensemble de la procédure (qui peut durer jusqu'à 3 h) se déroule sous anesthésie, sans réveil.

L'avantage de cette méthode est que la réponse réflexe du biceps femoris, dans ces conditions, est robuste, stable et très sensible aux antagonistes des récepteurs NMDA. En fait, il n'y a pas d'équivalent pour mesurer l'activité des antagonistes NMDA *in vivo* en termes de sensibilité et de robustesse. En comparaison avec n'importe quelle méthode *in vitro* ou *ex vivo*, cette méthode a l'avantage d'intégrer à la fois les caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des candidats médicaments (en d'autres termes, l'efficacité du candidat médicament vis-à-vis de sa cible et sa capacité à atteindre sa cible).

Cette méthode est en accord avec les 3Rs dans la mesure où elle se déroule entièrement sous anesthésie (pas de souffrance des animaux) et la robustesse des réponses permet d'évaluer l'activité des candidats médicaments avec un nombre très faible d'animaux par groupe. Elle n'est malheureusement pas remplaçable par des solutions alternatives n'utilisant pas d'animaux, car seule le test *in*

*vivo* permet de valider le fait que le candidat médicament a effectivement accès aux récepteurs NMDA du système nerveux centrale, et que ces récepteurs sont bloqués efficacement par le candidat médicament. Ce projet concerne l'utilisation de 90 rats sur 5 ans.

6199. Les maladies infectieuses sont fréquentes en élevage bovin, elles sont responsables de pertes économiques qui fragilisent les exploitations agricoles et impactent le bien-être des animaux. Le développement des connaissances sur l'immunologie des bovins est nécessaire pour améliorer les moyens d'intervention (dépistage des animaux infectés, prévention des maladies par la vaccination et l'amélioration des conditions d'élevage) permettant de réduire la fréquence et la sévérité des infections.

L'objectif du projet est d'acquérir de nouvelles connaissances sur les leucocytes sanguins (lymphocytes, monocytes, granulocytes) des bovins par l'étude de leurs caractéristiques et de leurs fonctions. Les études réalisées au laboratoire (*in vitro*) à l'aide des cellules isolées du sang d'animaux sains permettront d'obtenir des indications de base indispensables à l'étude ultérieure d'animaux infectés ou vaccinés. Ces études nécessiteront de prélever du sang sur des vaches laitières saines élevées en conditions conventionnelles. Un nombre de donneurs de sang suffisant pour la réalisation des travaux tout en évitant une fréquence élevée de prises de sang sera prévu. Chaque année, une douzaine d'animaux seront concernés, pour un total de 60 vaches laitières sur la période de 5 ans. Cette période est nécessaire car ces recherches ont un caractère évolutif, en fonction du développement des « outils » (matériels et réactifs) utilisés, et aussi en fonction de l'évolution des concepts et des questions scientifiques.

Le projet est conçu pour être en conformité avec les exigences 3R :

Remplacement : Comme chez l'homme, le prélèvement de sang est une méthode courante et peu invasive qui permet de ne pas porter atteinte à l'intégrité de l'animal.

Réduction : Deux groupes de 6 vaches seront suffisants chaque année du projet pour obtenir un nombre suffisant d'échantillons de sang sans imposer une répétition excessive des prises à chaque animal donneur.

Raffinement : Les prises de sang réalisées à la veine jugulaire ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être pris au cornadis pour la distribution des aliments. La douleur causée par l'aiguille ne nécessite pas d'anesthésie. Les animaux sont maintenus dans leur environnement habituel.

6200. La maladie d'Alzheimer se caractérise par l'accumulation de la protéine tau anormalement phosphorylée (=tauopathie) à l'origine de la dégénérescence neurofibrillaire dans le cerveau, ces deux caractéristiques sont présentes dans le modèle animal et elles seront étudiées comme marqueurs de pathologie. Notre cible est une enzyme qui synthétise les héparanes sulfates et dont l'expression est augmentée dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer. Dans un modèle d'Alzheimer chez le poisson zèbre, il a été démontré que l'inhibition de l'action de cette enzyme cible arrête l'évolution de la maladie. Les recherches précédentes ont déjà montré un rôle central de cette enzyme dans la progression de la maladie d'Alzheimer.

Ce projet a comme objectifs : 1) de valider une nouvelle cible pharmacologique dans la maladie d'Alzheimer et 2) de démontrer qu'une approche pharmacologique est possible pour éviter le développement et/ou la progression de la pathologie dans le cerveau des mammifères. Aucune méthode non-animale n'est disponible pour remplacer un modèle animal dans l'atteinte de ces objectifs.

Nous allons utiliser des animaux génétiquement modifiés (modèle de tauopathie rTg4510, caractéristique de la maladie d'Alzheimer) comme modèle de pathologie. Nous allons croiser ces animaux avec des animaux où la cible est éteinte et nous allons confirmer qu'en l'absence de la cible, la pathologie ne se développe pas. Sur le deuxième objectif nous allons également tester la capacité de produits à arrêter l'action biologique de la cible et l'effet de cette inhibition pharmacologique sur l'évolution de la pathologie dans le modèle de tauopathie (rTg4510 non croisé). Afin de valider que l'approche pharmacologique pourra être effective, nous allons dans un premier temps nous affranchir des aspects pharmacocinétiques comme le passage de la barrière hémato-encéphalique. Pour cela, nous allons directement injecter ces produits dans le cerveau, ce qui validera qu'un traitement par ces derniers pourra avoir un effet dans le développement et l'évolution de la pathologie. Le protocole à utiliser dans ce projet a été conçu pour obtenir un maximum d'informations avec un nombre d'animaux optimisé et statistiquement suffisant (n=10) pour chaque groupe de l'étude. Le projet est sur une durée de 5 ans, avec 6 procédures et prévoit d'utiliser 632 souris.

Afin de détecter et de limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, nous surveillerons leur état général et leur comportement. Une liste de vérifications contenant l'ensemble de points définis pour identifier la douleur ou détresse de l'animal est établie :

L'évolution du poids de la souris, l'état de ses poils, sa posture, sa marche et son comportement, l'exploration de son environnement, et l'état de la suture (pour les animaux ayant subi une opération). L'ensemble permet d'identifier si les animaux souffrent et en cas de douleur,

Les souris souffrantes seront transportées dans des cages isolées. La douleur sera prise en charge par injection d'antalgiques. En cas de non récupération observée nous allons consulter le personnel vétérinaire du laboratoire afin d'obtenir leur expertise en matière de signes cliniques de la douleur ou de la détresse.

6201. L'infertilité est un problème de santé publique majeur qui peut être traité par des techniques de procréation médicalement assistée. L'une de ces techniques consiste à manipuler les gamètes parentaux *in vitro* pour procéder à la fécondation. Au moment de la fécondation, la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte déclenche une série d'oscillations calciques répétitives nécessaires aux remaniements des génomes parentaux durant les premières heures. Dans l'espèce humaine, certaines formes d'infertilités sont liées à l'absence de réponse calcique. C'est pourquoi de nombreuses cliniques ont de plus en plus recours à des procédés *in vitro* d'activation artificielle visant à provoquer une vague artificielle de calcium en lieu et place du processus naturel.

Toutefois, les conséquences sur la santé des enfants ne sont pas connues. Ces nouvelles pratiques posent question car elles interviennent au cours de la phase d'activation de l'œuf, connue par ailleurs pour reprogrammer les génomes.

L'objectif de ce projet vise à mieux connaître les risques de la fécondation provoquée à l'aide de vagues calciques artificielles sur la santé des souriceaux. Il est le fruit d'une collaboration de notre laboratoire avec une équipe internationale qui a pu obtenir des spermatozoïdes dépourvus de la protéine (P) nécessaire au déclenchement de la réponse calcique.

Des ovocytes de souris seront fécondés *in vitro* par la technique dite de l'ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) avec des spermatozoïdes dépourvus de la protéine P fonctionnelle. Ces œufs seront soumis à des régimes calciques imposés et modulables par injection répétitive d'un second messager provoquant la libération transitoire du calcium stocké dans les réservoirs internes de l'œuf. Nous enregistrons et analyserons les réponses calciques. Par ailleurs, nous transférerons des œufs dans des femelles receveuses et nous enregistrons la croissance des animaux obtenus. Nous établirons des corrélations entre les régimes calciques imposés, la survie à terme et la croissance des animaux.

Ce travail doit permettre d'évaluer différents protocoles de stimulation calcique afin de favoriser la reprogrammation des génomes parentaux de l'œuf et améliorer le potentiel de développement à long terme.

Ce projet sera réalisé chez la souris et nécessitera l'utilisation de 350 souris sur cinq ans. Leur nombre a été réduit au maximum tout en permettant d'obtenir une estimation statistique solide. Seul des animaux peuvent être utilisés dans le cadre de cette étude pour identifier les risques sanitaires des nouvelles pratiques de la fécondation *in vitro*. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance et limiter tout stress lors des interventions sur les animaux. Le suivi quotidien des animaux hébergés dans un environnement enrichi (papier de ouate) et l'application de critères d'arrêt du suivi des animaux expérimentaux permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance et de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie, en accord avec la cellule du bien-être animal de l'installation expérimentale.

6202. La maladie à corps de Lewy (MCL) est la principale pathologie cognitive neurodégénérative de la personne âgée, après la maladie d'Alzheimer (MA). Elle commence entre 50 et 85 ans et représente 20% des patients déments. Le nombre de patients MCL en France est estimé à environ 200000. Les symptômes habituels de la MCL associent des troubles cognitifs comme des troubles de la mémoire, des troubles du comportement (illusions ou hallucinations visuelles), un syndrome parkinsonien -souvent discret en début de maladie- et des fluctuations attentionnelles. Au niveau cérébral, la MCL est caractérisée par la présence d'agrégats de protéines d'alpha-synucléine (AS), formant ce que l'on appelle les corps de Lewy. On retrouve ces agrégats dans la maladie de Parkinson (MP), sauf qu'ils sont localisés dans la substance noire, alors que dans la MCL, ils sont diffus dans l'ensemble du cerveau. Des agrégats d'AS sont notamment retrouvés dans l'hippocampe des patients MCL. L'hippocampe joue un rôle essentiel dans les processus de mémorisation et est une des premières structures impactées dans la MA. L'atteinte de l'hippocampe dans la MCL pourrait ainsi expliquer en partie la similitude des troubles cognitifs avec la MA. Les modèles animaux existant à l'heure actuelle sont créés pour modéliser la MP et présentent souvent cette atteinte prédominante de la substance noire.

Dans le cadre de l'étude de modèles murins de la MP, plusieurs équipes se sont penchées sur l'injection d'AS structurellement anormale et en partie agrégée (fibrilles) dans diverses structures cérébrales. Ces fibrilles sont capables de modifier la structure de l'AS endogène et ainsi de transmettre et de propager à la manière des protéines prions ces protéines anormales. Ces études ont permis de mettre en évidence l'intérêt de l'injection de ces fibrilles afin d'obtenir des modèles souris de MP.

Ce projet vise à injecter des fibrilles d'AS humaine dans l'hippocampe d'un modèle de souris surexprimant l'AS humaine de façon diffuse dans le cerveau, et d'en étudier les conséquences neuroanatomiques et fonctionnelles (comportement).

Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction et raffinement) et des calculs de puissance statistique, sachant que nous ne travaillerons qu'avec des souris mâles, qu'en plus de notre groupe de souris injectées avec des fibrilles, nous constituerons plusieurs groupes contrôles, groupes que nous étudierons à différents délais post-injection, nous estimons le nombre d'animaux utile à la réalisation de l'objectif à 90 souris. Afin de minimiser l'angoisse, la douleur et la souffrance (raffinement), les animaux sont manipulés 1 à 2 min/jour, durant la semaine précédant le début des tests comportementaux. Ces manipulations ont pour but d'habituer les souris à l'expérimentateur et aux conditions de l'expérience pour réduire au minimum le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage, de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux (réduction).

6203. La demande pour des analgésiques/antalgiques d'efficacité supérieure à celle des opiacés mais dénués d'effets secondaires n'est pas satisfaite. L'industrie pharmaceutique continue donc à investir activement dans la recherche de nouvelles classes d'analgésiques/antalgiques. Dans ces recherches, les molécules candidates aux essais cliniques sont sélectionnées quasi exclusivement sur la base de résultats comportementaux. Les échecs récurrents de l'industrie pharmaceutique dans la tentative de mise sur le marché de nouveaux antalgiques mettent en évidence la nécessité d'élaborer des stratégies de développements complémentaires ou bien alternatives, à celles basées sur une évaluation exclusivement comportementale de l'efficacité des candidats médicaments.

Une méthode complémentaire aux tests comportementaux consiste à mesurer directement l'activité électrique des neurones impliqués dans le codage de la douleur. Parmi ces derniers, les neurones dits « de projection » de la moelle épinière sont une cible de choix. Ces neurones reçoivent des informations directes et indirectes des fibres nerveuses périphériques à l'origine des sensations douloureuses. Ils projettent à leur tour vers les centres du cerveau impliqués dans la génération des sensations

douloureuses. La réponse de ces neurones (c.à.d. le nombre et la fréquence de potentiel d'action qu'ils génèrent) est proportionnelle à l'intensité nociceptive des stimuli, et elle est réduite (pour un stimulus d'intensité donné) par les traitements analgésiques/antalgiques.

L'utilisation d'animaux pour les tests d'efficacité d'analgésiques/antalgiques est rendue nécessaire par le fait que, dans de nombreux cas, le mécanisme d'action de ces médicaments est un processus complexe impliquant la totalité du système nerveux (de manière imagée, des communications entre le cerveau, la moelle épinière, et les tissus périphériques). La mesure de l'activité des neurones spinaux se fait chez l'animal anesthésié et permet donc de pouvoir tester l'efficacité de candidat médicament sur la réponse à des stimuli très nociceptifs, ce qui n'est pas envisageable chez un animal vigile. Ces tests apportent donc des informations indispensables au développement de nouveaux médicaments, informations qui ne peuvent être obtenues par d'autres moyens, tout en garantissant une absence de souffrance chez l'animal qui est anesthésié. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, plusieurs doses de candidat médicaments peuvent être testées chez un même animal. Le nombre d'animaux utilisés est aussi réduit d'une part, par le fait que chaque animal est son propre contrôle (principe des mesures répétées) et d'autre part ils sont utilisés de manière précoce dans le développement de candidats médicaments et la détermination de leur cible ; ces expériences permettent de réduire l'utilisation d'animaux dans des tests comportementaux qui ont tendance à générer par ailleurs des faux positifs.

Il est essentiel que ces expériences soient réalisées au sein d'un laboratoire très spécialisé pour garantir que chaque animal utilisé génère des données de qualités. Le but de ce projet est d'établir et d'utiliser des protocoles robustes d'enregistrement de ces neurones spinaux pour permettre le criblage de candidats médicament chez le rat et la souris anesthésiés dans le cadre d'une société de service pour l'industrie pharmaceutique. Il existe de nombreuses sociétés de service qui utilisent des animaux pour des tests comportementaux, mais il n'existe pas encore de société spécialisée dans le domaine de l'électrophysiologie *in vivo* pour la douleur dans le monde. Ce projet concerne l'utilisation de 900 rongeurs (rats ou souris) sur 5 ans.

6204. La douleur aigüe est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut donc découvrir de nouveaux médicaments, et pour ce faire, étudier les mécanismes responsables d'une douleur chronique. Au cours des dernières années, notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur s'est considérablement accrue. Pourtant, aucune avancée thérapeutique majeure n'est intervenue. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. En effet, qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts. Aussi, un médicament efficace sur les douleurs spontanées ne le sera pas nécessairement, par exemple, sur l'allodynie et inversement. D'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes. Le projet présent entre dans notre grand dessein de découvrir un traitement efficace pour l'allodynie mécanique. L'allodynie mécanique est le symptôme le plus fréquemment rencontré chez les patients douloureux chroniques : chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. De plus l'apparition d'une allodynie est un facteur de risque de chronicisation de la migraine. Il est donc primordial de trouver un traitement efficace pour ce symptôme. Comment le toucher devient-il douleur? On sait que la survenue d'une allodynie mécanique chronique provient de modifications du système nerveux central, notamment dans la corne dorsale de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du trijumeau, entraînant une interaction entre les voies sensorielles tactiles et les voies de la douleur.

Ces modifications résultent de l'activation de certaines cellules de ces circuits, principalement des neurones mais aussi des cellules gliales (astrocyte et microglie). Ces modifications sont associées à l'augmentation de la quantité d'une enzyme, l'extracellular signal-regulated kinase (ERK), sous sa forme active, appelée phospho-ERK (pERK). L'inactivation génétique, ou pharmacologique, de pERK prévient l'allodynie mécanique. Inhiber pERK semble donc un bon moyen de traiter l'allodynie mécanique. Cependant ERK est ubiquitaire et intervient dans de nombreuses fonctions nécessaires à la survie cellulaire. L'application systémique d'un inhibiteur de cette enzyme aura des effets secondaires importants. Ce projet vise à rechercher les événements moléculaires conduisant à l'activation de ERK, et ceux résultant de son activation. Bloquer ces événements pourrait présenter un intérêt thérapeutique pour l'allodynie mécanique.

L'expérimentation sur des animaux est nécessaire puisque l'apparition de la douleur fait intervenir de nombreux circuits neuronaux qui ne peuvent être reproduit artificiellement. 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 statistique de variance et tests post hoc). Au total 96 rats mâles, de 3 à 6 semaines, seront utilisés dans ce projet. Enfin ils seront hébergés dans un environnement avec une température optimale pour les animaux et avec un accès illimité à de la nourriture et à l'eau. Les cages contiendront 4 animaux, afin d'assurer des interactions sociales entre les individus, et un tube en carton, afin d'enrichir le milieu.

6205. La capacité d'adaptation est une caractéristique qui a été dégradée, chez les animaux de rente, par la sélection pour des niveaux de production élevés. Ce qui a eu des conséquences négatives sur la santé, la reproduction, et la longévité de ces animaux et par conséquent a impacté l'efficacité de production. Les causes du déclin de la capacité d'adaptation sont majoritairement inconnues. La capacité d'adaptation d'un animal est due à des mécanismes adaptatifs opérant à différents niveaux d'organisation

physiologique. Ils sont en partie sous le contrôle des conditions d'élevage et de nutrition (notamment dans le jeune âge), du statut physiologique de l'animal, mais aussi de son patrimoine génétique. Grâce à l'essor des techniques moléculaires, il est possible d'exploiter les outils de la génomique pour mettre en relation génotype et capacité d'adaptation aux différents niveaux d'organisation physiologique de l'animal, en intégrant des niveaux de description complémentaires : performance de production, métabolisme, expression des gènes et génome. Par ailleurs, nous émettons l'hypothèse que : i) la variabilité génétique sur la longévité fonctionnelle (ou durée de vie productive) impacte la capacité d'adaptation des adultes et que, ii) ces effets génotype peuvent être quantifiés par des challenges alimentaires court-terme chez l'adulte. L'objectif de ce projet est donc de mieux comprendre le rôle de la génétique sur les capacités d'adaptation des chèvres adultes. Pour y répondre, nous produirons et utiliserons 240 chèvres laitières de race *Alpine*, issues d'une sélection divergente sur le caractère de longévité fonctionnelle (120 chèvres par lignée). L'ensemble des chèvres sera génotypé et caractérisé sur des caractères de croissance, d'efficacité alimentaire, de production de lait, de santé et de réponse à des challenges nutritionnels (2 diètes de 48h en première lactation) afin de mieux comprendre les déterminants de la capacité d'adaptation des chèvres. L'ensemble des chèvres fera l'objet d'un suivi détaillé jusqu'à la fin de leur 3ème lactation, afin de permettre un suivi sur le long terme des performances.

Prise en compte de la règle des 3R :

- Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet (évaluer le lien entre génétique et capacité d'adaptation chez la chèvre : espèce cible et plus largement modèle ruminant) et des niveaux d'intégration des données, le modèle animal ne peut pas être substitué par un autre type de modèle.

- Réduction : le dispositif a été dimensionné pour permettre d'observer une différence statistique de longévité. Nous utiliserons 240 chèvres.

- Raffinement : les chèvres seront hébergées en groupe, sur une litière paillée. Elles seront nourries à volonté. Le milieu sera enrichi avec des pneus suspendus, régulièrement remplis de foin. Elles feront l'objet d'une surveillance journalière pendant toute la durée du protocole.

6206. L'objectif du projet est de caractériser les déficits comportementaux de souris *MRL/Lpr*, modèle murin du lupus érythémateux disséminé. Il s'agit d'une maladie auto-immune complexe et au diagnostic difficile. Inflammatoire et chronique, c'est une affection qui touche majoritairement les femmes et dont les symptômes et leur gravité varient beaucoup d'une personne à l'autre. Les atteintes peuvent être rhumatologiques, rénales, mais également cérébrales (chez au moins 75% des patients) avec l'apparition de troubles des fonctions émotionnelles et cognitives. Cette forme délicate de la maladie, encore très mal connue, constitue le lupus neuropsychiatrique encore appelé neuro-lupus. Notre projet tentera de mieux comprendre les aspects étiologiques, les manifestations comportementales et les raisons de sa chronicité, ceci permettant, dans un second temps, de découvrir une cible thérapeutique qui permet d'intervenir sur son installation et son développement chronique.

Des anomalies structurelles au niveau cérébral, possibles conséquences d'un déficit auto-immunitaire, pourraient être à l'origine des perturbations cognitives rapportées chez les patients. Il est cependant nécessaire de tester ces hypothèses dans un modèle animal. Actuellement, ces modèles restent des outils indispensables pour l'étude des maladies et l'évaluation de nouvelles thérapies. Ainsi, chez la souris *MRL/Lpr*, nous tenterons de mettre en rapport les déficits décelés dans des tests de cognition avec d'éventuelles anomalies cérébrales (atrophie hippocampique, baisse de prolifération neuronale).

Nous évaluerons les performances comportementales, plus particulièrement cognitives, de souris *MRL/Lpr* qui, dès leur livraison au laboratoire, seront placées en milieu enrichi et maintenues en groupes sociaux. Les souris constituant le groupe contrôle seront des souris *MRL+/+* ne présentant pas la mutation *lpr* qui rend la maladie exacerbée. Les tests comportementaux sélectionnés permettront d'évaluer l'état général, ainsi que les capacités motrices et psychomotrices. Du fait de l'existence d'une atrophie hippocampique lors du neuro-lupus, des tests sensibles à une atteinte des voies hippocampiques ont aussi été choisis. Enfin, certains tests devraient permettre d'évaluer le statut émotionnel de l'animal.

Des prélèvements urinaires (protéinurie) et sanguins (dosages d'autoanticorps, de cytokines pro-inflammatoires) seront réalisés en cours d'étude, ceci afin de mettre en parallèle la progression de la maladie sur les plans organique et comportemental.

L'ensemble de ce projet impliquera ainsi un total de 420 souris.

La première évaluation comportementale impliquera un total de 60 souris (15 par groupe, 2 groupes, étude réalisée deux fois).

Dans un second temps, nous testerons les propriétés neuroprotectrices de peptides. Cette deuxième partie du projet, qui sera également répétée afin de réduire les différences inter-individus et confirmer l'effet thérapeutique des nouveaux composés, comportera 360 souris.

Ce modèle murin développe les aspects de la pathologie retrouvée chez l'homme et actuellement, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire la complexité de cette maladie. De ce fait, le recours à ce modèle animal est indispensable (remplacement). Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous n'utiliserons que 15 animaux par groupe, ceci étant le minimum pour des études comportementales et pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle présentant une variabilité importante inter-individu (réduction)... Concernant les statistiques, nous utiliserons des tests non paramétriques, comme par exemple le test de Mann et Whitney.

Les souris seront régulièrement pesées et leur état général évalué quotidiennement, ce suivi permettant d'identifier les animaux en souffrance et de procéder, si besoin, à l'euthanasie des animaux. Nous enrichirons l'environnement des souris à l'aide de frises, tunnels, coton, et formerons des groupes sociaux (raffinement).

6207. Les troubles fonctionnels intestinaux (TFI) regroupent un ensemble de pathologies coliques dont le syndrome de l'intestin irritable (SII) est la plus fréquente. Les TFI affectent 10 à 20% de la population adulte occidentale, le SII représentant plus de

20% de ces pathologies intestinales. Le SII est défini, selon les critères de Rome III, par des douleurs abdominales et/ou un inconfort digestif associés à des modifications du transit (fréquence et consistance des selles). Le SII représente l'une des causes majeures de consultation en gastro-entérologie (plus de 30% des consultations), ce qui fait de cette pathologie un véritable enjeu de santé publique. Il est, de plus, reconnu comme un facteur majeur affectant la qualité de vie des individus qui en souffrent. L'origine de ces troubles fonctionnels intestinaux reste cependant mal connue. L'alimentation, le stress, la génétique ainsi que le microbiote intestinal sont étudiés pour leur implication dans ce syndrome. En effet, de plus en plus d'études s'accordent sur le rôle potentiel du microbiote intestinal dans l'étiologie du SII. Elles démontrent que le microbiote intestinal des sujets présentant le SII est différent de celui des sujets sains. Cet écosystème microbien complexe est composé de plusieurs centaines d'espèces différentes, majoritairement anaérobies strictes et a pour fonction majeure la dégradation de la matière organique présente dans le côlon (fibres alimentaires, les protéines, le mucus...) via les processus de fermentation bactérienne. L'utilisation de ces différents substrats aboutit principalement à la production d'acides gras à chaîne courte (acétate, propionate, butyrate) et de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone, sulfures et méthane chez certains sujets). Ainsi, la présence d'un déséquilibre au sein du microbiote intestinal peut conduire à des modifications des processus fermentaires conduisant à la production de métabolites potentiellement délétères. Grâce à des modèles d'animaux gnotobiotiques, nous avons mis en évidence, que la dysbiose du microbiote intestinale des sujets SII induisait une augmentation de l'excrétion d'hydrogène et des productions de sulfure d'hydrogène, deux gaz pouvant participer à la physiopathologie du SII (inconfort digestif, ballonnement, flatulences, hypersensibilité viscérale ...). A ce jour, les moyens mis en œuvre pour soulager les patients atteints du SII sont peu nombreux et majoritairement inefficaces. Dans ce contexte, l'utilisation de bactérie probiotique permettant de corriger la dysbiose intestinale et le métabolisme de l'hydrogène constitue une stratégie encourageante. L'administration de *Blautia hydrogenotrophica* à des animaux hébergeant le microbiote de sujets SII a déjà permis de diminuer l'excrétion des gaz et particulièrement l'hydrogène (brevet). L'objectif de ce projet sera d'étudier si l'administration de cette bactérie est capable d'influencer la composition du microbiote et/ou les fermentations coliques et ainsi de moduler la réponse de l'hôte à cette dysbiose. Nous nous intéresserons plus particulièrement à l'impact sur l'hypersensibilité viscérale (symptôme fréquemment associé au SII), et la perméabilité de celle-ci. Ces études seront conduites à l'aide de deux modèles animaux présentant une hypersensibilité viscérale associée à une dysbiose intestinale. Tout d'abord des rats *Fischer F441* gnotoxéniques à microbiote intestinal humain SII hypersensible ainsi qu'un modèle de rats *Fischer F441* conventionnels développé au sein de notre unité. Nous sommes capables de générer chez ces animaux une dysbiose intestinale proche de celle observée chez des sujets SII ainsi qu'une hypersensibilité viscérale en modifiant uniquement le microbiote par administration d'une bactérie commensale non pathogène. Les échantillons fécaux issus de sujets souffrants de SII proviendront d'une étude clinique visant à étudier l'impact du même probiotique sur la dysbiose intestinale. Pour le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux de chaque groupe a été réduit au minimum nécessaire pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements. Chaque expérience sera exploitée au maximum pour réduire le nombre d'animaux utilisés. 400 rats seront donc utilisés pour la totalité du projet. Les expériences proposées induisent un niveau de stress et de douleur légers et tout au long de l'expérimentation une surveillance sera mise en place pour détecter, réduire ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Des antalgiques seront administrés aux animaux si nécessaire.

6208. La réalisation d'une activité physique régulière fait partie intégrante des recommandations de prise en charge de l'obésité en pratique clinique. Cependant, l'incapacité à réaliser les exercices proposés est souvent une cause de réticence et de démotivation des patients. Les limitations des patients obèses étant nombreuses, elles réduisent significativement le bénéfice de l'entraînement. Depuis une dizaine d'années, l'exercice dynamique en mode excentrique est proposé dans de multiples situations pathologiques (BPCO, infarctus du myocarde, maladies métaboliques). Cette modalité d'exercice a pour particularité d'induire une faible sollicitation métabolique par rapport à la forte contrainte mécanique qu'il impose. Ce mode d'entraînement a cependant été très peu étudié dans le cadre de la réduction pondérale. Quelques travaux scientifiques récents chez l'Homme ainsi que des résultats préliminaires chez l'animal issus de notre laboratoire nous incitent à penser que l'entraînement excentrique s'avérerait particulièrement efficace dans la prise en charge de l'obésité. Les modalités d'exercice choisies dans cette étude permettent d'évaluer les effets de l'entraînement excentrique en comparaison au concentrique. Quatre groupes (Contrôle, Concentrique +15, Excentrique -15, Excentrique -30) seront réalisés, comprenant chacun 15 rats « *Wistar* ». Les groupes CON +15 et EXC -15 réaliseront sur tapis roulant la même quantité de travail (W). Les groupes CON +15 et EXC -30 réaliseront des entraînements sur tapis au même coût métabolique, c'est-à-dire à la même consommation d'oxygène (VO<sub>2</sub>). L'objectif principal est de confirmer l'hypothèse selon laquelle l'entraînement excentrique freine la prise de poids observée habituellement chez des rats « contrôle ». Les objectifs secondaires sont d'évaluer l'impact de l'entraînement sur les différents éléments clés de la régulation de la balance énergétique (dépense énergétique de repos et prise alimentaire spontanée) et de préciser les mécanismes impliqués. A la fin de l'étude, les animaux seront euthanasiés afin d'étudier les mécanismes microscopiques sous-jacents (histologie musculaire, respiration mitochondriale et synthèse protéique musculaire). Un maximum de mesures seront prises afin de respecter la règle des 3 R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Les paramètres mesurés dans ce projet (évolutions du poids et de la composition corporelle) ne permettent pas l'utilisation d'un modèle cellulaire (Remplacement). Le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum et limité à 15 (pour les 4 groupes impliquant 60 animaux utilisés dans le projet) tout en permettant d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante (Réduction). Enfin, une phase d'habituation au tapis roulant sera menée avant le début du protocole et la durée des séances d'entraînement sera progressivement incrémentée afin de limiter au maximum le stress physique et psychique induit par l'exercice (Raffinement).

6209. L'ostéoporose est la principale pathologie osseuse. Elle se traduit par un risque accru de fracture et impacte considérablement la qualité de vie. La prise en charge actuelle est limitée à la fois par une prophylaxie non systématique et par les effets secondaires des traitements curatifs. Dans ce contexte d'abstention thérapeutique fréquente, la nécessité de développer de nouvelles modalités de prise en charge est donc cruciale pour les professionnels de santé. L'utilisation de composés alimentaires végétaux représente une alternative innovante et prometteuse en raison de leurs propriétés biologiques spécifiques. Nous avons effectivement récemment démontré dans le cadre d'une étude préclinique qu'un polyphénol (la fisétine) prévient l'établissement de manifestations ostéoporotiques. L'association d'un extrait de plante titré en fisétine avec une molécule de DHA, dont les effets bénéfiques sur la santé sont largement décrits, présente un potentiel très intéressant.

L'utilisation d'un modèle animale est nécessaire dans cette étude car il permet d'évaluer l'impact des régimes sur les os en prenant en compte l'ensemble des régulations physiologiques propres à un organisme. Les procédures expérimentales ne sont pas nombreuses et très bien maîtrisées au sein du laboratoire. Le nombre d'animaux (108 souris réparties en 9 groupes) utilisés a été déterminé pour répondre à une puissance statistique suffisante, dans le respect de la règle des 3 R : Des expérimentations *in vitro* préalables ont permis d'optimiser les groupes tests et les variables étudiées, de réduire le nombre d'animaux et remplacer certains gestes. Les procédures de prise en charge de la douleur sont adaptées au respect des animaux.

6210. La production de gaz à effet de serre (GES) dans les systèmes de production de ruminants est particulièrement préoccupante en raison de leur implication dans le changement climatique mondial. Parmi les GES, le méthane est produit dans le rumen par la fermentation microbienne anaérobie de composants d'alimentation. Les ruminants sont la principale source agricole de ce gaz à effet de serre puissant qui a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO<sub>2</sub>. La production de méthane représente aussi une perte d'énergie pour l'animal de 6% à 8% de l'apport alimentaire. Il est donc essentiel de réduire ces émissions de méthane, et les additifs alimentaires sont une voie de réduction reconnue comme efficace. L'objectif de cette étude est de vérifier si l'effet antiméthanogène obtenu à l'occasion d'un traitement à la naissance sera maintenue durant la vie. Ce type d'expérimentation ne peut pas être remplacé par des modèles *in vitro* mais le nombre d'animaux et la méthodologie choisie tient compte des critères de réduction et raffinement (règle 3R). Pour cela, 60 animaux seront utilisés à partir de la naissance et pour une période maximale de 24 mois. Les brebis donnant naissance aux 60 agneaux seront aussi utilisés dès la mise bas jusqu'à au sevrage à 8-10 semaines. La progéniture des agnelles (30 agneaux) seront suivis pendant la deuxième année d'expérimentation pour une période de 5 mois. Concernant, le raffinement des animaux, une attention particulière a été portée aux conditions d'hébergement (= condition d'élevage). Celles-ci seront maintenues en groupe durant l'expérimentation afin de respecter leur comportement social. Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour leur état et leur comportement.

6211. Les maladies auto-immunes représentent la troisième cause de morbidité dans les pays industrialisés après le cancer et les maladies cardiovasculaires. Parmi les maladies auto-immunes, le lupus érythémateux systémique (LES) reste à ce jour une maladie incurable. Pour tester de nouveaux médicaments dans le LES, le modèle de choix est la souris *MRL/Lpr*. En effet, ces souris développent une pathologie auto-immune semblable à la forme humaine tant au niveau des signes cliniques que du développement progressif d'une insuffisance rénale.

Ce projet est la suite d'un projet débuté en 2015, qui avait pour objectif principal de proposer une alternative thérapeutique au LES en utilisant des anticorps monoclonaux (Acm). Ces Acm ciblent une protéine importante dans le fonctionnement des cellules immunitaires et en particulier des lymphocytes. En effet, nous avons démontré que la voie induite par cette protéine était fortement perturbée chez tous les malades souffrant de LES et que l'utilisation d'Acm propriétaires était efficace *in vitro* pour corriger ces anomalies. De plus, nous avons démontré que l'utilisation à de faibles concentrations des anticorps monoclonaux (Acm) ciblant une protéine importante dans le fonctionnement des cellules immunitaires et en particulier des lymphocytes, réduisait de façon significative les signes cliniques et l'insuffisance rénale des souris *MRL/Lpr*.

L'objectif de ce projet consiste à définir une dose optimale des Acm propriétaires sélectionnés lors de l'étude précédente afin de prolonger la survie des souris *MRL/Lpr* et à plus long terme de proposer chez l'homme, une alternative thérapeutique aux traitements actuels qui présentent des effets secondaires importants.

Le protocole expérimental vise à comparer une immunothérapie, le Rituximab (anti-CD20), utilisée dans le LES, à nos anticorps propriétaires dans les souris lupiques *MRL/Lpr*. Du fait des différences importantes observées entre les mâles et les femelles *MRL/Lpr*, et pour tenir compte de la prédominance féminine du lupus chez l'homme (sexe ratio 9/1), toutes les expériences seront réalisées sur des souris femelles.

Afin de limiter le nombre d'animaux en expérimentation nous n'utiliserons que les Acm ayant démontré (1) une efficacité dans notre première étude, (2) une non-toxicité cellulaire *in vitro* dans un modèle cellulaire préalablement validé.

Le nombre maximal de souris estimé pour ce projet sera de 42 souris *SWISS Crl:CFW(SW)* et 285 souris *MRL/Lpr*. Il est prévu d'utiliser au maximum 4 doses de chaque Acm pour pouvoir sélectionner la dose la plus efficace. Nous utiliserons comme contrôle le tampon d'administration seul (tampon d'injection stérile apyrogène de qualité PPI (Préparation Pour Injection)).

Notre projet respecte le principe des « 3R » :

- Remplacer: La validation *in vivo* des observations faites dans des lignées cellulaires ne peut se faire que sur un modèle animal de LES. Nous avons choisi le modèle murin comme méthode alternative au modèle primate non humain. Actuellement aucune application *in silico* ne permet de remplacer le modèle *in vivo* pour l'étude de nouvelles immunothérapies.

- Réduire: Nous avons réduit au maximum le nombre de souris (327), permettant une analyse statistique significative de la toxicité et de l'effet de dose.

- Raffiner: Notre projet respecte également le « bien-être animal », les conditions d'élevage et l'enrichissement. Nos animaux sont hébergés dans une animalerie agréée. Les cages, grilles et litières sont changées chaque semaine et des igloos et tunnels sont ajoutés. Nous avons optimisé notre procédure en définissant des points limites permettant d'identifier le moment à partir duquel la souffrance et /ou la détresse de l'animal doit être arrêtée.

6212. Ce projet de recherche vise à approfondir les connaissances sur l'axe « lumière-mélatonine-stress-immunité » en utilisant le sandre comme modèle biologique. Grâce à ses nombreuses qualités organoleptiques et atouts économiques, le sandre *Sander lucioperca* pourrait constituer une voie stratégique de diversification de l'aquaculture continentale européenne. Cependant, cette espèce répond fortement au stress, ce qui semble impacter son statut immunitaire. Cette dépression du système immunitaire expliquerait ainsi les fortes mortalités observées dans son élevage. Selon plusieurs observations et études, il a été émis comme hypothèse que la lumière est un facteur déterminant pour le bien-être du sandre. Les données disponibles décrivent ainsi une préférence pour des intensités lumineuses faibles. Ces préférences sont liées à la présence d'un tapetum lucidum dans la rétine. Il s'agit d'une membrane réfléchissante augmentant fortement la sensibilité de l'œil à la lumière lui permettant ainsi d'améliorer sa vision dans des milieux très sombres.

La mélatonine, communément appelée hormone du sommeil, est une hormone dont la production est sous le contrôle de la lumière et dont le principal rôle est l'entraînement des rythmes circadiens (activité locomotrice, activités métaboliques, pigmentation...) et circannuels (reproduction, croissance). Plusieurs études suggèrent également, chez les poissons, un contrôle du système immunitaire par la mélatonine. Cette dernière, dans le cas du sandre, pourrait ainsi jouer un rôle essentiel dans l'interaction entre l'environnement lumineux, l'axe de contrôle de la réponse physiologique au stress et le système immunitaire. Dans ce projet, ces interactions seront étudiées à travers les effets d'un gradient photopériodique sur le système immunitaire, la sécrétion de mélatonine et l'activité de l'axe de réponse au stress.

Différents objectifs ont ainsi été définis : (a) mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le rôle immunomodulateur de la mélatonine ; (b) déterminer les effets d'un gradient photopériodique positif et négatif sur la sécrétion de mélatonine, le statut immunitaire et la réponse au stress ; et (c) caractériser la réponse au stress en réponse à un stress de manipulation sous photopériodes longue et courte. À cette fin, des sandres seront maintenus dans 12 bassins expérimentaux dans les meilleures conditions définies pour leur élevage. Après 1 mois d'acclimatation (J30) sous photopériode constante (12h de lumière/12h d'obscurité), un gradient photopériodique naturel positif sera appliqué pour la moitié des bassins et l'autre moitié sera sous gradient photopériodique naturel négatif. Après un peu plus de deux mois (J100), les gradients seront stabilisés pendant 15 jours et la réponse à un stress de manipulation sera évaluée. Ce stress de manipulation imitera celui-ci vécu par les sandres en élevage. Afin de répondre aux objectifs, 216 individus seront prélevés et mis à mort pour évaluer les paramètres physiologiques et immunitaires sur divers organes. Des individus supplémentaires (1284) seront utilisés afin d'optimiser le bien-être des poissons car une faible densité est défavorable pour la croissance et le comportement des espèces grégaires comme le sandre. Ces individus supplémentaires seront gardés en vie à la fin de l'expérimentation.

Le Remplacement par des méthodes cellulaires ou moléculaires est impossible à ce stade vu la complexité des interactions que nous souhaitons étudier ici. Le nombre de poissons par groupe a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique a priori suffisante mais aussi nécessaire pour espérer obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (Réduction). En vue de limiter l'impact de cette expérience sur les organismes, les prélèvements de sang se feront après anesthésie et les prélèvements des organes cibles seront effectués après mise à mort. Et, tout au long de l'expérience, l'apparition des points limites (changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire, apparition de nécroses ou de champignons) sera surveillée et toute souffrance de l'animal déclenchera sa sortie de l'expérience (Raffinement).

6213. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare, caractérisée par une augmentation chronique de la pression artérielle pulmonaire, conduisant à l'insuffisance puis la défaillance cardiaque droite et à la mort. En France, l'incidence annuelle d'HTAP est estimée à 2,5 cas par million d'habitants adultes correspondant à une prévalence estimée à 15 cas par million d'habitants. Il n'existe pas de traitement curatif de l'HTAP et en dépit des traitements qui améliorent la qualité de vie et la survie, la médiane de survie reste inférieure à 5 ans. De plus, la seule alternative pour les cas réfractaires est la greffe de poumons. De nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Dans l'HTAP, la défaillance cardiaque droite est secondaire au remodelage des petites artères pulmonaires, un processus complexe et multifactoriel. La dysfonction endothéliale, la prolifération incontrôlée des cellules musculaires lisses, ainsi que l'inflammation chronique jouent un rôle dans la pathogenèse de l'HTAP. Les approches *in vitro* utilisant des cultures cellulaires ont permis d'identifier certains mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP. Toutefois, seul le recours à l'expérimentation animale permet de retrouver l'ensemble des acteurs au sein d'un même modèle permettant les interactions très complexes entre les systèmes respiratoire, cardiovasculaire, et immunitaire.

Plusieurs études épidémiologiques et cliniques ont montré un intérêt des acides gras polyinsaturés oméga 3 dans la prévention primaire et secondaire des maladies cardiovasculaires. En effet, la consommation d'oméga 3 sous forme de poisson, d'huile de poisson ou de composés purifiés a été associée à une diminution du risque cardiovasculaire dans diverses populations à risques. Ainsi, l'étude italienne GISSI-prevenzione a montré une diminution de la mortalité cardiovasculaire de l'ordre de 30 % chez des patients post-infarctus du myocarde recevant une formulation d'oméga 3.

Le but du présent projet est d'étudier l'effet d'une formulation optimisée d'acides gras polyinsaturés omégas 3 sur l'hypertrophie ventriculaire et le remodelage cardiaque droit, et sur la dysfonction et le remodelage vasculaire pulmonaire dans un modèle



d'HTAP. Pour ce faire, l'hypertension pulmonaire sera induite par une injection unique sous-cutanée de monocrotaline et les rats seront suivis pendant 21 jours avant l'évaluation des paramètres cardiaques et hémodynamiques.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 60 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que le développement de l'HTAP est un processus complexe issu des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. Toutefois, la mise au point de la formulation optimisée en oméga 3 et l'identification de certains mécanismes moléculaires ont été faits à l'aide de méthode alternative. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation des techniques d'évaluation du système cardiovasculaire (réactivité vasculaire, échocardiographie, immunofluorescence) et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux).

6214. L'objectif de notre projet est de développer des anticorps polyclonaux et monoclonaux dirigés contre des petites molécules d'intérêt, des marqueurs ou bien des cibles cellulaires. L'immunisation des animaux correspond à la même démarche que les vaccinations humaines. On vaccine les humains pour développer des anticorps dirigés contre des cibles spécifiques. Le système immunitaire des animaux produit des anticorps de haute affinité et spécificité contre les molécules injectées.

Les anticorps produits sont destinés à être utilisés comme outils biochimiques dans certaines techniques par les laboratoires de recherche (identification et quantification de molécules dans des tissus biologiques). Nous avons un large panel de molécules qui peuvent permettre l'étude d'un grand nombre de pathologies notamment les maladies neurodégénératives (ex : Alzheimer, SLA...) et les cancers.

Les animaux utilisés pour ce projet seront des lapins, des rats et des souris. La durée du projet sera de 5 ans.

Tout au long du protocole d'immunisation, le même nombre d'animaux sera utilisé. La production de plusieurs anticorps sera effectuée en parallèle. Le même protocole sera appliqué à tous les animaux.

Après synthèse et validation de l'immunogène (petite molécule d'intérêt), nous procéderons à deux immunisations (injection de l'immunogène) successives à des animaux. Un prélèvement sanguin permettra d'évaluer la production et la qualité des anticorps à l'aide de tests immunolymphatiques. Une troisième immunisation sera faite si la qualité des anticorps n'est pas satisfaisante. Lorsque les paramètres immunochimiques des anticorps seront satisfaisants, l'animal sera mis à mort et son sang contenant les anticorps sera prélevé.

Les dommages causés aux animaux sont principalement l'injection de produits visqueux lors de l'immunisation et des prélèvements sériques. Cependant, les rongeurs restent le seul moyen pour la production d'anticorps. De plus, nous obtenons pour notre protocole une bonne qualité d'anticorps par rapport aux faibles volumes de sérum prélevés.

Conformité de la règle des 3R :

Remplacer : Le système immunitaire des êtres vivants est le seul moyen d'obtenir des anticorps spécifiques dirigés contre les petites molécules et de répondre aux exigences scientifiques, aussi bien au niveau quantitatif que qualitatif. Les immunisations *in vitro* dans la bibliographie n'ont pas donné de résultats satisfaisants ; en effet, le nombre de lymphocytes activés spécifiques qui va produire des anticorps contre l'immunogène est très faible sur l'ensemble des clones activés lors d'une immunisation et cela mettrait en échec la tentative d'obtenir des anticorps dirigés contre les petites molécules.

Réduire : nous utilisons un minimum d'animaux. La production d'immunogène est faite « *in vitro* » : une étude du rapport de couplage petite molécule/protéine porteuse et leur stabilité est réalisée avant les immunisations. Si l'étude n'est pas satisfaisante l'étape de l'expérimentation animale ne sera pas faite.

5 rats et 5 souris ainsi qu'un lapin seront utilisés par projet, soit au maximum 60 lapins, 500 souris et 500 rats sur 5 ans. Pour les souris et les rats ce nombre est nécessaire car une réponse adéquate n'est obtenue que seulement pour 20 à 30% des animaux.

Raffiner : les animaux et leurs conditions d'hébergements seront surveillés tous les jours. Les pièces seront climatisées et les cages seront enrichies avec plateformes (pour les lapins) plus des cell-play, des bâtonnets brick et des cell-tubes.

L'état général des animaux sera vérifié chaque jour. Nous vérifierons la présence d'éventuelle anomalies comportementales (activité/motricité, symptôme de stress, perte d'appétit), d'atteintes cutanées (abcès, nécrose, perte de poils...). S'il y a une ou plusieurs anomalies le protocole sera immédiatement arrêté et les animaux seront mis à mort.

Concernant la douleur, nous réaliserons seulement des immunisations et des prélèvements pendant la durée du projet. Ces immunisations seront effectuées sous anesthésie. De plus les immunisations et prélèvements seront pratiqués par un animalier diplômé et expérimenté ce qui diminuera le stress et l'inconfort de l'animal.

Finalité de l'étude : permettre aux chercheurs de répondre à des questions scientifiques sur des modèles animaux ou sur des tissus, ainsi que le développement de kits diagnostic/pronostic.

6215. La glyco-génose de type 1a est une maladie génétique rare caractérisée par une incapacité de l'organisme à produire du glucose (sucre) pour maintenir sa glycémie (taux de sucre dans le sang) entre 2 repas. La maladie se caractérise par des hypoglycémies sévères, rapidement après un repas. A l'âge adulte, la plupart des patients développent une maladie rénale. Des données de la littérature ont montré que le développement de cette pathologie rénale est très semblable à celui des patients diabétiques. La maladie rénale chronique est d'abord silencieuse puis peut être mise en évidence par la présence d'albumine dans les urines (microalbuminurie). En progressant lentement, mais irréversiblement, elle évolue vers une insuffisance rénale. A l'exception d'un contrôle nutritionnel très strict limitant les hypoglycémies, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette maladie chronique rénale (MCR). La dialyse puis transplantation rénale sont les seules solutions lorsque l'insuffisance rénale est atteinte.

Le but de ce projet est de tester des médicaments largement utilisés pour traiter la MCR des patients diabétiques afin de prévenir ou ralentir le développement de cette pathologie rénale chez les patients atteints de glycogénose de type 1a. Ce projet sera réalisé grâce à l'obtention par transgénèse ciblée (mutation du gène uniquement dans les reins) d'un modèle de souris original et viable atteint de glycogénose de type 1a. Ces souris développent au cours du temps la pathologie rénale, avec l'apparition des premiers signes cliniques (microalbuminurie) dès 6 mois, mais en l'absence d'épisodes d'hypoglycémie. Les traitements des souris débiteront dès l'apparition d'une microalbuminurie pour prévenir au mieux l'évolution de la pathologie. Les souris seront traitées pendant 3 à 6 mois avec un suivi régulier de l'évolution de la MCR par mesure de marqueurs biologiques dans le sang et les urines.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R :

**Remplacement :** cette étude est difficile à réaliser chez l'homme car le nombre de patients est très limité et la pathologie est progressive et évolue sur plusieurs années. Il est donc nécessaire de démontrer l'efficacité de ces traitements chez les souris atteintes de glycogénose de type 1a. Aucune approche en culture cellulaire ne permet d'apprécier l'efficacité du traitement sur la maladie rénale.

**Réduction :** Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur l'évolution de la pathologie dans ce modèle animal. Il est important de noter qu'une grande partie des analyses sera effectuée uniquement sur le cortex rénal qui représente environ 100 mg de tissu/rein. Cette contrainte explique le nombre de 16 souris/groupe pour obtenir assez de tissu pour réaliser ensuite une analyse statistique. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction ou incluses dans un autre projet. Au total, ce projet nécessitera au maximum 96 souris sur une période de 3 ans. Dans un souci de raffinement des méthodes, les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson. Ils seront suivis quotidiennement et pesés régulièrement. La bonne connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. Les premiers signes de la maladie rénale (microalbuminurie) apparaissent dès 6 mois, sans conséquence sur le bien-être animal. L'apparition d'une insuffisance rénale (accumulation de déchets comme l'urée dans le sang) est plus tardive, entre 15 et 18 mois, et s'accompagne d'une perte de poids importante. Le suivi du poids des souris et des marqueurs biologiques (réalisé uniquement sur la moitié du groupe de souris soit 8 souris/groupe) permettront de connaître régulièrement le stade d'évolution de la maladie des souris traitées et non traitées. La maladie étant silencieuse avant l'apparition de l'insuffisance rénale, les souris ne devraient pas présenter de mal-être avant la fin du protocole prévue à 9 et 12 mois. Les médicaments seront ajoutés aux croquettes ou à l'eau de boisson afin d'éviter le gavage quotidien des animaux. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole (9 ou 12 mois) selon les méthodes autorisées par la législation afin d'analyser les reins.

En conclusion, les expériences réalisées chez la souris devraient permettre de valider l'utilisation de ces médicaments dans le cadre du traitement de la maladie rénale qui se manifeste chez la plupart des patients adultes atteints de glycogénose de type 1a.

6216. Chez les animaux d'élevage, la mesure de la température interne (Tint) est un phénotype classiquement mesuré pour évaluer leur statut physiologique. En pratique, les variations de la Tint d'un animal peuvent être expliquées par des facteurs liés aux conditions d'élevage (sanitaire, environnement, climat, etc..) mais également par des facteurs liés à l'animal (niveau d'activité, comportement alimentaire, potentiel de croissance, etc..). Le développement de capteurs permettant une mesure en continu de la Tint est un enjeu important pour caractériser l'état physiologique des animaux d'élevage. Le monitoring en continu de la Tint et une analyse *ad hoc* des données recueillies pourraient constituer une source d'informations intéressante dans le futur pour assister l'éleveur dans la gestion de son troupeau. A l'heure actuelle, la méthode de référence pour le suivi de la Tint est basée sur des mesures ponctuelles via l'utilisation d'un thermomètre rectal. Cette méthode rend difficile un suivi en continu de la Tint et l'immobilisation de l'animal inhérente à la prise de température peut constituer un biais dans la mesure. L'utilisation de la radio télémétrie pour le suivi de la Tint est une alternative intéressante qui a été récemment validée chez des porcs entre 55 et 100 kg.

L'objectif de ce projet est de suivre la température interne des animaux en continu (1 mesure toutes les 5 min) de la naissance à la fin de la vie productive (abattage) sur un total de 12 animaux.

Ce protocole respecte la règle des 3R appliquée à l'expérimentation animale. Cette étude est une étape importante pour démontrer qu'il est possible de suivre de manière précise l'état physiologique des porcs en limitant les interventions directes (et donc le stress) sur les animaux. Cette mesure doit à terme être utilisée comme un outil de diagnostic pour anticiper et corriger efficacement les désordres physiologiques liés à certaines conditions d'élevage. En pratique, la modélisation des variations du rythme de la température interne selon l'âge ou en réponse à des fluctuations des conditions d'élevage (sanitaires, climatiques, etc.) contribuera à la construction de modèles de décision et pourra, dans une certaine mesure, faire respecter la règle de remplacement dans les expérimentations animales futures (remplacement).

L'utilisation de capteurs de température permet de mesurer beaucoup plus précisément la température interne des animaux et donc de limiter le nombre d'animaux à utiliser dans nos futures expérimentations. (Réduire). Dans cet essai, la mise en lot (effet sexe intra bande, prise en compte d'un effet loge, etc.) nous permet de limiter le nombre d'animaux à mettre en expérimentation, via le contrôle des principaux facteurs d'élevage influençant l'évolution de la température chez les porcs. Pour réduire le stress des animaux, ils seront placés dans les conditions d'élevage conventionnel (en groupe) et la structure du groupe sera conservée tout au long de la période de croissance. Les animaux seront surveillés régulièrement, afin de permettre une intervention immédiate en cas de souffrance, maladie ou tout autre problème (raffiner).

6217. L'incidence de la stéatose hépatique (NAFLD) est de 20 à 30% au niveau mondial. Elle atteint même 33% en Europe où elle continue à augmenter en parallèle avec les cas d'obésité et de diabète. À ce jour, il n'existe pas de thérapeutique pour ces

maladies qui ne sont encore traitées que par intervention diététique, voire par un changement radical du mode de vie, des approches peu satisfaisantes en termes d'observance des malades. Disposer d'un traitement efficace capable de prévenir ou de traiter la NAFLD permettrait d'empêcher la survenue et la mortalité observée aux stades avancés de la NASH, ainsi que les autres pathologies associées.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de type oméga-3, comme l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6), offrent un potentiel thérapeutique par leur double rôle, car ils présentent à la fois des effets bénéfiques contre les dyslipidémies, mais également un effet protecteur contre la neurodégénérescence. À l'aide d'un processus original que nous avons breveté, nous avons modifié l'AGPI dans le but d'améliorer sa stabilité, sa biodisponibilité, ainsi que sa bioactivité (PIo3-1). Notre étude évaluera la plus-value de cette modification sur les propriétés du PIo3-1 : les objectifs de ce projet sont de tester cette molécule en tant qu'agent thérapeutique chez une souris modèle de NAFLD induite par un régime hyperlipidique, et conjointement, de comparer ses effets chez la souris contrôlée placée sous régime standard. L'étude s'articulera en 2 périodes successives pour une durée totale de 22 semaines, et inclura 82 souris C57BL/6JRj mâles âgées de 12 semaines. Après une habitude, un premier lot de 70 individus recevra soit un régime standard, dans lequel les lipides ne représenteront que 10% de l'apport calorique quotidien (STD, Groupes 1, 2 et 3, 10 souris/groupe), soit un régime hyperlipidique riche en graisses représentant 60% de l'apport calorique quotidien (Groupes 4, 5, 6 et 7, 10 souris/groupe) dans le but d'induire la NAFLD. Ces 12 semaines révolues, chaque groupe recevra soit le régime seul (Groupes 1, 5), soit le régime supplémenté par le DHA comme référence (Groupes 2, 6), ou par le PIo3-1 (Groupes 3, 7). Le groupe 4 (régime HL) recevra le régime STD, ce qui permettra d'évaluer l'intérêt de la supplémentation par DHA ou PIo3-1 en comparaison à un régime normo-calorique. Chaque régime sera délivré en accès libre.

Un second lot de 12 souris (c'est-à-dire 6 souris placées sous régime STD et 6 souris en régime HL) sera utilisé en parallèle pour la collecte des tissus et les analyses biochimiques. Ils serviront comme référence du statut lipidique et biochimique avant le changement des régimes.

Les animaux seront hébergés individuellement sur toute la durée de l'expérience, afin d'éviter la mise en place d'une hiérarchie de dominance dans les cages (cette démarche permettra d'éviter qu'une souris empêche ses congénères d'accéder à la nourriture) et permettra également de quantifier la prise alimentaire.

Le milieu sera enrichi à l'aide de papier carré végétal et de briquettes de bois. Les cages transparentes seront placées les unes à côté des autres, afin que les animaux puissent se voir.

De plus, ils pourront communiquer par vocalisations ultra-soniques, les couvercles des cages étant constitués de grilles. Ainsi, bien que placés individuellement, les souris ne seront pas isolées au sens strict du terme.

L'évolution dans le temps des paramètres biochimiques sera analysée sur un échantillon sanguin prélevé par voie mandibulaire, à raison d'un prélèvement à trois temps de l'étude : au lancement de l'expérimentation, à 12 semaines (changement de régime), puis à la fin du protocole.

Selon ce même schéma, nous évaluerons l'activité de ces animaux (test en open field), ainsi que leur anxiété (test du labyrinthe en croix surélevé) et leurs capacités de mémoire à court terme (test du labyrinthe en Y), d'apprentissage et de mémoire à long terme (test de Barnes). Les évaluations comportementales seront également réalisées la veille de chaque prélèvement, soit 3 fois au cours de l'ensemble de la période expérimentale.

À la fin de l'étude (semaine 22), les souris seront mises à mort pour prélèvement des tissus et analyses biochimiques.

Ce type d'étude ne peut être réalisé que sur des animaux vivants, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les effets réels, délétères ou bénéfiques sur les fonctionnements hépatique et cérébral (Remplacer).

L'étude sera réalisée sur 82 souris. L'effectif par groupe a été fixé au minimum possible, tenant compte des différents types d'analyses post mortem menées sur les tissus à la fin du protocole, mais aussi de la nécessité d'obtenir des données comportementales statistiquement exploitables (Réduire).

Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffiner).

En cas de dépassement de l'un des points limites définis (perte de poids de plus de 20% du poids initial sans récupération au bout de 4 jours, arrêt de la prise alimentaire solide et/ou liquide, état général traduisant une évolution vers la morbidité), les animaux seront mis à mort par une surdose d'anesthésique.

6218. D'après l'American Cancer Society, 1,6 million de nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués chaque année uniquement aux États-Unis, avec une mortalité associée de plus de 35%. Les options thérapeutiques peuvent être systémiques (chimiothérapie) ou loco-régionales (chirurgie, radiothérapie). Dernièrement, la chirurgie oncologique a perdu du terrain en raison de l'émergence de traitements d'ablation tumorale, une approche loco-régionale de traitement anticancéreux. Les traitements d'ablation sont devenus l'un des principaux traitements locaux dans les tumeurs d'organes solides. Les principales indications sont des tumeurs d'un diamètre inférieur à 5 cm, situés en général dans les reins, le pancréas ou le foie. Les traitements d'ablation tumorale s'appliquent également aux tumeurs du poumon, de la prostate, du sein et du cerveau. Des nombreuses modalités de thérapies d'ablation existent aujourd'hui, et elles peuvent être classées selon leur principe d'action. Les plus utilisées sont les thérapies thermo-ablatives, qui peuvent être divisées en deux types : ablation par hyperthermie (températures élevées) ou cryoablation (basses températures). Dans le cas des ablations par hyperthermie, l'ablation par radiofréquence (RFA) et l'ablation par micro-ondes (MWA) sont les plus fréquemment utilisés. Elles se différencient principalement dans le temps requis pour l'ablation et les températures atteintes pendant l'administration. L'ablation par micro-ondes présente comme avantage un temps d'application moindre et des températures plus élevées que l'ablation par radiofréquence.

Après avoir appliqué une thérapie d'ablation, il est nécessaire aujourd'hui d'attendre environ 45 jours pour effectuer une étude d'imagerie et déterminer si un résultat favorable ou non a été obtenu lors de la procédure. Si le résultat a été négatif, 60 jours

supplémentaires sont nécessaires avant d'effectuer une nouvelle séance de thérapie. Tout ce temps d'attente représente un énorme gaspillage qui peut être fondamental chez les patients atteints de cancer. Ainsi, il est important d'essayer de le réduire au maximum. Avec cette étude, nous aimerions évaluer la corrélation entre des modalités d'imagerie telles que la tomodensitométrie (CT), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou l'élastographie ultrasonographique et le temps écoulé après l'ablation. De cette façon, nous étudierons s'il est possible de prédire les résultats de l'ablation peu de temps après que celle-ci ait eu lieu.

Le projet répond aux conditions 3R:

Remplacement: afin de tester les complications, la durée des procédures, la sûreté et l'efficacité des approches percutanées dans le tractus digestif en phase préclinique, il est nécessaire d'utiliser des animaux vivants. Le cochon est le modèle le plus répandu dû à sa taille ainsi que son anatomie abdominale, ce qui permet de transposer les procédures plus facilement vers l'humain.

Réduction: il s'agit d'une étude pilote pour laquelle il n'y a pas de base statistique sur laquelle nous pourrions définir le nombre d'animaux nécessaires. Cependant, le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé afin de minimiser la quantité nécessaire. Ainsi, en accord avec le principe de réduction et basé sur notre expérience, nous estimons que 4 animaux seront nécessaires pour cette étude.

Raffinement: il est prévu que toutes les procédures soient effectuées sous anesthésie générale et avec un contrôle de la douleur pendant l'opération. Les contrôles peropératoires seront effectués par un personnel hautement qualifié.

6219. La sélection des porcs est traditionnellement évaluée par la mesure de leurs performances de croissance lorsque les animaux reçoivent des aliments de bonne qualité leur permettant d'exprimer leur potentiel de croissance. Actuellement, des aliments contenant des matières premières à forte teneur en fibres sont de plus en plus utilisés dans les élevages de production, notamment pour réduire le coût de production lié à l'alimentation. Il est possible que les porcs sélectionnés sur des critères de performances obtenus à partir d'aliments de bonne qualité ne soient pas les mieux à même de valoriser des aliments fibreux parce qu'il existe une variabilité dans la capacité digestive des porcs. Par ailleurs, il est probable que l'aptitude à digérer les fibres soit influencée par la composition du microbiote intestinal des animaux. Ce partenaire indispensable de la digestion est actuellement ignoré dans les outils utilisés pour la sélection des porcs. De nouvelles biotechnologies de caractérisation du microbiote intestinal sont aujourd'hui disponibles et devraient permettre de mieux quantifier l'impact de la composition du microbiote sur l'efficacité alimentaire et digestive des porcs.

Le protocole mis en place vise à acquérir des données, en particulier des échantillons de fèces, pour deux projets complémentaires. Le premier a pour but d'évaluer le déterminisme génétique de l'aptitude des animaux à digérer les aliments en se focalisant sur deux régimes alimentaires contrastés : un régime alimentaire « standard » et un régime enrichi en fibres. Le second a pour but d'étudier le rôle du microbiote intestinal dans l'efficacité alimentaire et digestive des animaux et son interaction avec le régime alimentaire.

Une méthode de mesure de la capacité digestive des porcs, compatible avec l'élevage en groupe des animaux, a été développée récemment. Elle suppose d'analyser par Spectrométrie dans le Proche Infra-Rouge (SPIR) des échantillons de fèces collectés ponctuellement sur les individus. Cette méthode sera appliquée aux échantillons de fèces collectés dans le protocole.

L'expérimentation sera conduite sur 1624 porcs de race *Large White* répartis en deux lots et nourris avec deux régimes alimentaires différents sur l'ensemble de la période de croissance (entre 35 et 115kg). Un lot témoin de 812 porcs sera alimenté avec un aliment « standard » ayant une teneur en fibres modérée. Un second lot de 812 porcs issus des mêmes parents sera alimenté avec un régime enrichi en fibres. Le nombre d'animaux à contrôler a été calibré pour être en mesure d'estimer si 1) les gènes d'un verat influencent de façon significative l'expression des performances d'efficacité alimentaire et digestive de ses descendants mais aussi la composition de leur microbiote et 2) s'il existe des corrélations de nature génétique entre l'efficacité alimentaire, le microbiote et les critères de qualité de la viande. L'existence d'une variabilité d'origine génétique permettrait d'identifier des animaux moins sensibles à la nature des aliments et de proposer aux élevages de production des individus plus robustes face aux différentes conduites alimentaires. De même, si la composition du microbiote est héritable et explique une part non négligeable de l'efficacité alimentaire et digestive, une nouvelle voie d'amélioration génétique de l'efficacité alimentaire pourrait être explorée pour co-sélectionner des individus ayant des microbiotes efficaces.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur des animaux sont requises car l'objectif de l'étude est d'explorer l'intérêt de nouveaux critères (capacité digestive, microbiote) sur la sélection des animaux sur l'efficacité alimentaire et pour lesquels aucune donnée n'est disponible. Réduction : le nombre d'animaux du protocole a été calibré afin de disposer du nombre minimum d'échantillons pour permettre l'estimation des paramètres génétiques des nouveaux caractères étudiés. Raffinement : les méthodes de phénotypage mises en œuvre ont été développées pour permettre d'élever les animaux en groupe dans des conditions d'élevage normales et pour être applicables à un prélèvement ponctuel de fèces par animal.

6220. Les filières animales sont confrontées à des demandes croissantes de prise en compte des impacts environnementaux de leurs pratiques, tout en restant compétitives. Pour la filière laitière bovine, la recherche d'une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote consommé par les vaches via les fourrages et les concentrés est un levier majeur, afin de limiter le poids économique d'un apport excédentaire et de réduire les rejets environnementaux engendrés par ce surplus. Il faut pour cela travailler avec des indicateurs simples et peu coûteux, suffisamment robustes et fiables afin d'évaluer l'impact sur l'environnement et de piloter finement l'alimentation azotée des animaux. Le taux d'urée du lait, aujourd'hui accessible en routine par les dosages, fait partie de ces indicateurs de conduite, en complément d'informations sur l'alimentation. L'urée du lait est en effet le meilleur indicateur de l'azote excrété par les vaches. Des développements sont néanmoins nécessaires pour améliorer son utilisation en élevage.

Notre projet a pour objectif de construire des outils, testés en situation réelle, pour mieux interpréter cet indicateur à la fois au niveau des ateliers laitiers pour évaluer la pratique du rationnement azoté et à des échelles plus agrégées pour évaluer les impacts des pratiques d'alimentation sur l'environnement. Ces outils s'appuient en particulier sur la modélisation des flux d'urée à l'échelle de l'animal afin de caractériser les différentes voies d'excrétion et d'analyser l'influence de différents facteurs liés à la ration, à l'animal et à son environnement. Une méta-analyse de la littérature (réalisée en 2016) et les premières analyses du modèle mettent en évidence plusieurs facteurs clés parmi lesquels la clairance rénale (mécanisme d'élimination de l'urée corporelle via l'urine) et les flux d'urée non urinaires (notamment via la sueur) qui, s'ils sont négligés, pourraient conduire à des biais dans le calcul des bilans azotés à l'échelle de l'animal (entrées d'azote par la ration moins les sorties d'azote dans le lait, l'urine, les fèces). Pour approfondir ces questions, un essai expérimental sera conduit en 2017. Cet essai aura pour but de suivre les variations de flux d'urée à l'échelle de l'animal en fonction de la ration (plus ou moins riche en azote) et de la température ambiante (plus ou moins élevée) chez la vache laitière. Les objectifs de cet essai seront 1) de mieux caractériser les flux d'azote et d'urée à l'échelle de l'animal selon différentes stratégies d'alimentation et 2) de quantifier les flux d'urée non urinaire (en particulier via la sueur) susceptible de biaiser les calculs de clairance de l'urée et d'expliquer au moins en partie les bilans azote non équilibrés retrouvés en grande majorité dans la littérature (un bilan entrées-sorties positif indiquant une sous-estimation potentielle des sorties). Dans ce cadre, 2 traitements expérimentaux seront croisés. Le premier traitement consistera à faire varier l'urémie et l'excrétion d'urée par la modulation des apports en azote dans la ration (une ration N- autour de 13% de MAT et une ration N+ autour de 17% de MAT ; MAT = matières azotées totales). Le second traitement consistera à quantifier la teneur en urée de la sueur selon deux situations contrastées : une température ambiante constante proche de la thermoneutralité (pas de stress thermique, environ 18°C), et une situation avec des pics de chaleur diurnes (autour de 25 à 28°C) entrecoupés de phases de récupération nocturnes (autour de 20°C). Durant cet essai, des bilans entrées-sorties seront réalisés pour le suivi des flux d'azote et d'urée. La caractérisation fine des flux d'urée sera réalisée par le suivi d'urée marquée <sup>13</sup>C après injection en intraveineuse et des prises de sang en cinétique pour illustrer le mécanisme de clairance. La mesure de l'urée marquée dans le liquide ruminal permettra de mettre en évidence le recyclage d'azote via l'urée dans le cas de rations "bas azote" (N-). Enfin, un dispositif de collecte de la sueur à la surface de la peau permettra de vérifier l'existence d'un mécanisme d'excrétion de l'urée par la sueur.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier l'effet de l'alimentation azotée sur les flux d'azote et d'urée à l'échelle de l'animal, incluant des mécanismes de recyclage/mobilisation. Réduire : Le schéma expérimental en carré latin ainsi que le traitement statistique des données permettront de répondre aux objectifs scientifiques tout en limitant le nombre d'animaux à 8 dans ce projet. Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

6221. Les atteintes cérébrales sont variées, pas toujours comprises et souvent associées au vieillissement. Parmi ces affections se trouvent, entre autres, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer et autres démences, la maladie de Parkinson. Il y a aussi les troubles d'ordres psychiatriques, des maladies qui apparaissent principalement comme des anomalies de la pensée, des sensations ou du comportement, entraînant une détresse ou un dysfonctionnement. La majorité de ces maladies sont associées au processus de mémorisation. Cette liste n'est malheureusement pas exhaustive.

Dans le monde, des centaines de millions de personnes sont atteintes de troubles neurologiques. En France, on n'estime qu'une personne sur trois est concernée par une de ces maladies, que ce soit de façon directe ou indirecte.

Le fonctionnement du cerveau est sous-tendu par des activités électriques entre les différentes structures cérébrales. Ces activités électriques sont appelés oscillations cérébrales et peuvent être mesurées par des techniques d'électroencéphalographie (EEG). Ces oscillations sont différentes en fonction des activités du cerveau (les diverses phases de sommeil sont chacune caractérisées par un type d'onde différent par exemple). Quand une activité requiert l'activité de plusieurs zones du cerveau, les ondes émises par ces différentes zones sont alors synchronisées. Enfin les oscillations sont aussi dépendantes de l'état pathologique : en effet, un sujet atteint d'Alzheimer va avoir des oscillations différentes d'un sujet sain.

On peut dire que les oscillations sont des marqueurs des activités d'un cerveau, mais aussi des marqueurs de l'état de santé général d'un cerveau. Les activités EEG sont largement conservées à travers les mammifères permettant ainsi une transposition fiable entre l'humain et le rongeur. Actuellement, les composés à visée thérapeutique en développement sont obligatoirement évalués avant toute demande d'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché). De plus, la recherche manque de modèles prédictifs fiables et rapides à réaliser. Le développement de nouveaux médicaments est très coûteux et prend beaucoup de temps. Afin d'optimiser ce développement, il faut utiliser des marqueurs d'évaluation d'efficacité quantifiable, fiable et facilement transposable entre les études précliniques et cliniques.

Dans ce projet nous allons étudier les modifications EEG spontanées et induites chez des animaux normaux « contrôles » et des animaux mimant une pathologie humaine. Nous utiliserons des rongeurs (rats et souris), chez lesquels nous retrouvons les mêmes aires cérébrales ainsi qu'un fonctionnement électrophysiologique similaire à celui observé chez l'homme.

Chez ces animaux, des pathologies neurologiques et psychiatriques peuvent être modélisées.

Dans une première phase du projet nous identifierons des signatures électrophysiologiques d'un état pathologique en enregistrant les activités EEG spontanées et induites par des sons. Une fois ces signatures EEG identifiées nous testerons des molécules en développement afin d'identifier leur potentiel thérapeutique. Nous utiliserons des groupes de 20 animaux par lot afin d'obtenir des données fiables avec un pouvoir statistique fort.

Dans le but de réduire le nombre d'animaux, ceux-ci seront traitées en cross over (tous les animaux reçoivent toutes les molécules avec à chaque fois une vérification de l'EEG avant une nouvelle administration - chaque animal étant son propre contrôle). Pour ce projet, nous aurons besoin de 2400 souris et 1200 rats, soit 3600 animaux au total.

Tout au long des expérimentations, le bien-être des animaux est vérifié et des mesures antalgiques seront mises en œuvre si nécessaire.

6222. La très grande majorité des porcs subissent une caudectomie (coupe de la queue) dans les jours qui suivent la naissance pour éviter des problèmes de caudophagie (cannibalisme de queue) pendant la période de post-sevrage et surtout d'engraissement. Cette caudectomie réduit fortement le risque de caudophagie mais ne l'élimine pas. La coupe de queue est source de douleur. La caudophagie est aussi une source de douleur et de stress pour les animaux et d'une perte économique pour les éleveurs. Pouvoir prédire les épisodes de cannibalisme permettrait de réduire leur gravité, voire de les éviter complètement. Ces épisodes sont associés à des modifications anormales de l'activité comportementale, en particulier de l'agitation, qui pourraient servir de prédicteurs. Cependant ces modifications sont difficilement détectables par les éleveurs. Disposer d'un système automatique de détection de ces modifications permettrait d'avancer considérablement dans cette problématique et donc d'améliorer le bien-être des porcs. Le projet correspond à la seconde phase d'un projet de mise au point d'un système automatique de détection des problèmes comportementaux et notamment des signaux précurseurs du cannibalisme de la queue. Le projet prend en compte la règle éthique des 3R. Il est nécessaire de travailler sur des porcs vivants puisqu'il s'agit de mettre au point une méthode automatique de suivi de leur comportement. Nous travaillerons sur 32 porcs en engraissement dont 15 seront porteurs du système électronique. Ces animaux n'auront subi aucune des interventions habituellement pratiquées en élevage de porcs (réduction de la longueur des dents et de la queue chez les mâles et les femelles et castration des mâles). Le nombre d'animaux est justifié car travailler sur deux groupes de porcs par sexe est un minimum pour observer le maximum de situations représentatives de la vie des porcs et induire des épisodes de cannibalisme. Par ailleurs, les quatre loges comporteront 8 porcs mâles ou femelles afin de travailler sur des groupes de taille suffisante pour que les relations sociales soient proches de celles rencontrées dans les élevages commerciaux. Les procédures appliquées aux animaux (pose d'une bague à l'oreille, regroupement d'animaux non familiers) sont fréquentes dans les élevages commerciaux et sont de classe légère. Les animaux seront observés pour détecter d'éventuels problèmes (lésions, maladie) et seront traités en conséquence de façon à limiter au maximum les souffrances potentiellement éprouvées par les porcs.

6223. Les cancers de la tête et du cou sont des cancers fréquents (5ème cancer le plus fréquent en France) avec une incidence importante chiffrée à plus de 15000 nouveaux cas par an. Le type histologique le plus rencontré est le carcinome épidermoïde. L'alcool et le tabac sont les facteurs de risque les plus importants. Plus récemment, il a été mis en évidence une association entre le portage du virus HPV (Human Papilloma Virus) et le développement de ce type de tumeur, notamment chez les patients jeunes sans intoxication éthylo-tabagique. Malgré les avancées en termes de traitement et de dépistage, les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ont un taux de morbidité important, classés à la septième place des décès par cancer.

La maladie thrombotique est caractérisée par une hypercoagulabilité du sang pouvant aboutir à des accidents thrombotiques, avec notamment la survenue de phlébites (occlusion veineuse le plus souvent situées aux membres inférieurs) et la survenue d'embolies pulmonaires (occlusion de l'artère pulmonaire ou de ses branches, potentiellement fatale en l'absence de traitement). L'association thrombose et cancer est une entité maintenant bien connue depuis sa première description par Armand Trousseau en 1865. Certains cancers sont associés à un risque pro-thrombotique élevé, comme les adénocarcinomes du pancréas ou encore les adénocarcinomes gastriques. D'autres sont en revanche réputés pour être moins à risque de thrombose, c'est notamment le cas pour les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (cavité buccale, oropharynx et larynx).

Des études cliniques récentes ont cependant suggéré une élévation significative des événements thrombotiques (phlébites, embolies pulmonaires) chez les patients atteints par ce type de lésion. Notre projet a pour but d'évaluer le risque thrombotique associé aux carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou et plus précisément ceux de la langue. Le but final étant d'obtenir des arguments en faveur de l'instauration ou non d'un traitement antithrombotique chez les patients porteurs de ce type de tumeur et de réduire ainsi la mortalité et la morbidité en rapport avec la maladie thrombotique ou à défaut des complications iatrogènes liées à l'utilisation par excès de ces traitements.

La thrombose est un phénomène dynamique et complexe nécessitant l'intervention de nombreux acteurs cellulaires (plaquettes, cellules de l'inflammation, cellules endothéliales), de nombreux facteurs moléculaires (facteur de la coagulation, molécules d'adhésion...) et de nombreuses conditions physiques et chimiques (flux, calcium). Une exploration performante de la thrombose ne peut donc être envisagée autrement que sur le vivant, en accord avec le principe de remplacement.

L'utilisation d'un modèle vivant avec un système hémostatique dont les principes fondamentaux sont similaires à l'homme est nécessaire pour conduire ce projet. La souris a cette capacité, elle est d'ailleurs très largement utilisée dans les études portant sur la thrombose. Elle présente par ailleurs l'intérêt de pouvoir être utilisée comme modèle en cancérologie, notamment comme modèle pour le cancer de la langue (carcinome épidermoïde).

Les procédures expérimentales de notre projet reposeront principalement sur le développement d'un modèle de cancer de la langue chez la souris d'une part et sur l'évaluation de la thrombose d'autre part. Nous envisageons d'utiliser différents modèles :

- Un modèle syngénique orthotopique (injection de cellules cancéreuses de lignée murine à la souris immunocompétente, au niveau de la cavité buccale)
- Un modèle avec chimio-induction (application répétée d'un toxique carcinogène au niveau de la cavité buccale)
- Un modèle xénogénique orthotopique (injection de cellules cancéreuses de lignée humaine chez la souris immunodéficiente).

De nombreuses techniques de laboratoires sont disponibles pour étudier la thrombose chez la souris, les plus performantes sont celles permettant une étude dynamique *in vivo*. Nous envisageons ce type de méthode dans notre projet (microscopie intra-vitale en fluorescence et en temps réel). Cela présente l'intérêt d'une évaluation d'emblée performante de la thrombose limitant ainsi de nombreuses expérimentations annexes (nécessitant un plus grand nombre d'animaux), en accord avec le principe de réduction. Le nombre d'animaux inclus dans notre expérimentation sera de 60 souris en accord avec les conditions et la puissance statistique escomptée de notre expérimentation.

En accord avec le principe de raffinement, toutes les procédures en rapport avec le développement tumoral (injection ou application de toxique) chez la souris seront conduites sous anesthésie (inhalation d'isoflurane ou injection intrapéritonéale d'anesthésiants). Les procédures potentiellement douloureuses (comme les injections) seront systématiquement accompagnées de l'administration d'antalgiques.

La surveillance des animaux sera quotidienne. De plus, les éventuels signes de douleurs, de la perte de poids (pesée tous les 2 jours) et de la prise correcte d'aliment seront évalués. Tout animal présentant des troubles majeurs de l'alimentation (amaigrissement, déshydratation manifeste), ou un comportement de souffrance non traité par les antalgiques sera mis à mort sans délai. Toutes les mesures d'hébergement et d'enrichissement nécessaires au bien être animal seront mises en œuvre : vie en collectivité, enrichissement du milieu (Nestlets, habitats, cachettes), boisson et alimentation à volonté.

6224. Ce projet s'inscrit dans un contexte social qui s'intéresse aux populations vivant sur des territoires contaminés par la radioactivité en situation post-accidentelle et particulièrement aux effets éventuels des contaminations chroniques à faibles doses au travers des générations (effet multi et transgénérationnel). Il est établi que l'expression des gènes d'une cellule dépend non seulement de l'information contenue dans son ADN mais également à de nombreuses régulations moléculaires. Ainsi, les facteurs environnementaux agissant à faibles doses au niveau de la lignée germinale (polluants chimiques, rayonnements ionisants...) pourraient par ce biais modifier le profil de l'expression d'un certain nombre de gènes susceptibles d'être transmis à la descendance.

L'objectif de ce projet consiste à rechercher et étudier les possibles effets transmissibles dans les générations suivantes après une contamination chronique et à faible dose d'une population (F0) de rats (mâles et femelles) par un polluant environnemental tel que le césium-137 (situation post-accidentelle type Tchernobyl ou Fukushima). Cette étude permettra d'évaluer et de mieux comprendre les mécanismes biologiques susceptibles d'être engagés sur plusieurs générations (F1 à F4) par l'utilisation d'approches analytiques globales et innovantes en se plaçant au niveau de l'ADN et du métabolisme des individus. Elle utilisera aussi des approches d'analyse fonctionnelle de systèmes physiologiques majeurs tels que ceux associés au comportement et à la reproduction. L'utilisation d'un modèle animal se justifie ici car l'analyse d'effets subtils observés dans des systèmes de régulation complexes nécessite de pouvoir étudier l'organisme dans sa globalité. Ce protocole utilise une population de rats constituée de 5 générations d'animaux (F0 à F4), comportant chacune différents sous-groupes expérimentaux de 20 animaux, eux-mêmes répartis en fonction de l'exposition ou du sexe des individus. Pour des résultats exploitables statistiquement, des études précédentes du laboratoire ont montré la nécessité de travailler avec de tels effectifs. Le nombre de rats prévu pour ce projet est de 900.

Des collectes de sang et d'urines ainsi que des tests comportementaux seront réalisés pour chacune des générations étudiées. Ce protocole n'induit aucune souffrance ou détresse des animaux. L'anesthésie gazeuse sera utilisée à chaque fois qu'un stress pourrait être infligé à l'animal. Les prélèvements de tissus et d'organes seront réalisés en fin d'expérimentation sous anesthésie. Cette étude sera mise à profit avec la cryoconservation d'une collection de tissus d'intérêt (sang, os, cerveau, foie, gonades, rate, cœur, artères...) qui pourront être utilisés ultérieurement dans le cadre d'études supplémentaires.

6225. Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de décès dans le monde : 30% des décès annuels (plus de 23 millions de décès en 2011, dont 4 millions en Europe). L'hypercholestérolémie est un facteur de risque associée au développement des MCV. Le cholestérol provient i) de l'alimentation, ii) de la synthèse endogène effectuée dans le foie et iii) de l'élimination à partir des tissus hépatiques et extra-hépatiques. Les approches thérapeutiques actuelles pour réduire les taux de cholestérol plasmatique chez l'Homme reposent sur des approches visant à inhiber la biosynthèse du cholestérol et réduire l'absorption du cholestérol et des acides biliaires dans le tractus gastro-intestinal. Bien que ces approches paraissent attractives, elles présentent plusieurs limites telles que la proportion importante de patients qui n'y répondent pas (20-30%) et leurs effets secondaires néfastes (par ex, diabète). Nos travaux antérieurs ont démontré que le microbiote intestinal impacte la cholestérolémie et qu'il pourrait constituer une nouvelle stratégie pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Trois voies bactériennes principales peuvent être associées dans la modulation de la cholestérolémie par le microbiote intestinal : 1) la conversion du cholestérol en coprostanol, composé non absorbé au niveau des intestins, 2) la conversion des sels biliaires primaires solubles en sels biliaires secondaires insolubles grâce aux hydrolases de sels biliaires et 3) la fixation du cholestérol par les bactéries lors de leurs croissances. Dans le cadre de travaux récents, nous avons identifié i) une bactérie productrice de coprostanol et ii) une bactérie lactique produisant une hydrolase de sels biliaires. De plus, une autre bactérie lactique déjà connue pour sa capacité à fixer le cholestérol, est disponible dans notre laboratoire. Des études préliminaires ont montré que ces différentes bactéries sont capables de s'implanter dans le tube digestif de la souris.

Afin d'analyser l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie, nous étudierons dans un premier temps le devenir du cholestérol chez la souris. Pour cela, nous utiliserons un groupe de souris C57BL/6J contenant un microbiote intestinal normal (n=10) qui sera gavé avec du cholestérol marqué aisément quantifiable. Cette analyse permettra de suivre le cholestérol dans les principaux compartiments physiologiques suivants : intestin, foie, tissus adipeux, microbiote et sang.

Dans un deuxième temps, nous étudierons l'impact du microbiote sur le métabolisme du cholestérol. Pour cela, nous utiliserons 6 groupes de souris dépourvues de microbiote intestinal /axénique (n=10) qui recevront le microbiote intestinal d'un sujet sain faiblement producteur de coprostanol et d'hydrolase de sels biliaires (ce qui limitera l'effet de ces deux voies sur la cholestérolémie) et recevront un régime alimentaire standard. Après s'être assurés de l'implantation du microbiote transplanté (20 jours), 6 groupes de souris seront constitués : un groupe ne recevant aucune bactérie, 4 groupes recevant chacun soit la bactérie productrice de coprostanol, soit la bactérie productrice de l'hydrolase des sels biliaires, soit la bactérie fixatrice de cholestérol, soit l'ensemble des trois bactéries. Le dernier groupe recevra du rosuvastatine (traitement utilisé actuellement pour baisser la cholestérolémie). Toutes ces souris seront pesées chaque jour, le seul traitement étant constitué par le régime alimentaire riche en lipides et en cholestérol. Les expériences de transplantation fécale et de traitement avec les bactéries ou les statines seront réalisées par gavage orogastrique par du personnel compétent et expérimenté.

Remplacer : L'analyse de l'impact du microbiote intestinal sur la cholestérolémie nécessitant l'utilisation d'un organisme complexe, le recours à l'animal est indispensable. En effet, les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire ou de culture d'organe. Dans cette étude nous voulons valider *in vivo* des résultats obtenus *in vitro*, c'est pour cette raison que nous allons utiliser des souris.

Réduire : Le nombre minimum d'animaux nécessaire ( $10 + 6 \times 10 = 70$ ) a été déterminé grâce à un test statistique appliqué à chaque expérience, et grâce aux données acquises lors d'expériences préliminaires.

Durant l'expérience, des prélèvements de fèces sont effectués dans la litière ou lors de la manipulation de la souris (ce qui provoque une défécation naturelle) pour toutes les souris. De même, un prélèvement de sang au niveau de la joue sera effectué sur toutes les souris, pour mesurer la cholestérolémie conformément à la réglementation. Une attention particulière sera portée aux animaux pendant les minutes qui suivent le prélèvement afin de s'assurer de l'absence d'hémorragie et de diminuer au maximum la perte de sang. Si nécessaire, une légère pression au niveau de la joue sera effectuée pour arrêter les écoulements sanguins. Si une hémorragie survient et ne peut pas être arrêtée, l'animal sera alors euthanasié afin de mettre fin à ses souffrances. Raffiner : Les souris seront hébergées, soit individuellement sur une courte durée de 3 jours (procédure 1), soit à raison de 5 souris par cage (procédure 2), dans lesquelles l'eau et la nourriture seront disponibles à volonté. Un enrichissement sera assuré par ajout de papier absorbant, de bâtons de bois à ronger, de tunnels en carton. Pendant toute la durée de l'expérimentation, l'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel compétent ce qui permettra l'intervention rapide en cas de problème.

6226. La perte de substance osseuse touche de nombreuses personnes en France et dans le monde. C'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. Les principales causes de ces pertes de substances osseuses sont secondaires à des traumatismes, des chutes, des accidents domestiques ou de la voie publique, des blessures par balle ou des exérèses tumorales.

La technique de reconstruction osseuse de référence actuelle est la greffe osseuse, associée à une stabilisation chirurgicale des abouts osseux par plaques et vis.

Cependant, la douleur du site donneur, le temps de chirurgie prolongé et donc un risque accru d'infection ont incité les chercheurs sur le développement de nouveaux substituts osseux, permettant de diminuer le temps de cicatrisation osseuse, avec de nouvelles solutions à base de matériau fonctionnalisé permettant une reconstruction osseuse efficace et rapide, sans passer par la greffe osseuse.

Ce projet a pour objectif de suivre l'évolution au cours du temps de la reconstruction osseuse, grâce à des matériaux fonctionnalisés (possédant des propriétés ostéoconductrices) dans un modèle de perte de substance osseuse au niveau du fémur chez le rat et stabilisé par l'utilisation de plaques et de vis chirurgicales.

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 modèle de fracture dans un organisme entier vivant. En effet, le comportement d'un 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 perte de substance osseuse fémorale, stabilisée par plaques et vis chirurgicales est un modèle qui mime bien les techniques chirurgicales utilisées en médecine humaine, permettant une utilisation translationnelle aisée des techniques et matériaux chez l'animal. De plus, le rat est 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).

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 suivis tout au long de l'étude (Réduire). Lors de ce projet, 5 études d'efficacité de nouveaux matériaux fonctionnalisés seront réalisées. Pour chacune de ces études, 40 rats seront utilisées, soit un total de 200 animaux.

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 qui s'imposent rapidement et de façon adéquate.



6227 Depuis 2003, le cancer est la principale cause de décès en France dont l'incidence ne cesse d'augmenter. La plupart des chimiothérapies anticancéreuses actuelles présentent une toxicité systémique importante limitant l'augmentation des doses administrées et par conséquent les résultats thérapeutiques attendus. Les nanomédicaments, qui incorporent des molécules médicamenteuses dans des véhicules de taille nanométrique (milliardième de mètre), représentent un espoir important pour le traitement de cette pathologie de par leur capacité à cibler des tissus ou des cellules malades. Certains nanomédicaments sont déjà sur le marché et d'autres en essai clinique pour le traitement des maladies qui n'ont actuellement pas de thérapie efficace. Les espoirs dans les nanotechnologies laissent entrevoir la perspective de médicaments plus efficaces. Les animaux ont un rôle essentiel en recherche préclinique et le développement d'un nouveau médicament nécessite la mise en place d'expériences chez le rongeur.

Il a été récemment démontré que l'on peut construire des nanomédicaments par couplage chimique de principes actifs anticancéreux à des polymères de polyester. Le projet global de l'équipe est de fabriquer de nouvelles formes de nanomédicaments injectables contenant des molécules anticancéreuses à visée thérapeutique. Les nanomédicaments sont supposés présenter moins de toxicité mais il faut cependant évaluer l'innocuité des vecteurs utilisés pour fabriquer ces nanoparticules. Un des challenges est de concevoir dans un premier temps des vecteurs à base de polymères de polyesters biocompatibles et biodégradables.

Par ailleurs, les nanomédicaments sont capables de protéger la molécule active de la dégradation par les enzymes de l'organisme, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible, et de contrôler sa libération, permettant ainsi de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la lutte contre les cancers. En cancérologie, on part du principe que plus la dose du médicament sera élevée plus les chances de succès seront grandes. Cependant, l'efficacité thérapeutique en cancérologie est toujours un compromis entre toxicité et activité des molécules. L'évaluation de l'efficacité anticancéreuse de ces nanomédicaments va être précédée par l'étude de la toxicité des nanomédicaments. Cette étude de toxicité est fondamentale car elle permettra de déterminer à la fois la dose maximale tolérée par les animaux et la dose optimale en principe actif qu'on pourra utiliser ultérieurement dans l'évaluation de l'efficacité anticancéreuse sur des modèles de cancer. La dose maximale tolérée correspond à la dose maximale sans effet toxique ou avec un effet toxique minime n'affectant pas la survie des animaux. L'évaluation de la toxicité n'est pas seulement basée sur la survie ou la mort des animaux, mais aussi sur des critères cliniques (évolution pondérale, état général, activité motrice, ...).

Les études de toxicité doivent être faites *in vivo* afin d'évaluer la toxicité de la nouvelle molécule dans un organisme entier, toxicité qui est liée à son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination. Cette chaîne de phénomènes complexes fait intervenir différents organes et systèmes biologiques et ne peut pas être mimée *in vitro*. Ces études serviront pour l'ensemble des modèles de cancer qui seront étudiés par la suite.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement les plus prometteuses seront testées *in vivo*. Par ailleurs, une étude statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Ces 2 études nous permettront une réduction du nombre d'animaux utilisés. On prévoit de tester maximum 20 nouvelles nanoparticules sur 5 ans. Pour la réalisation de cette étude le nombre total d'animaux est estimé à 768 souris sur les 5 années. Les souris recevront 5 injections de médicaments et seront suivies pendant 1 mois.

Le bien-être des animaux sera pris en compte. Les animaux seront observés tous les jours (pesée, aspect général) et l'étude sera arrêtée dès que les points limite définis préalablement seront atteints. Les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'individus compatibles et bénéficieront d'un environnement enrichi.

6228. Certains patients atteints de cancer comme des leucémies ont besoin de recevoir une greffe de moelle osseuse. Préalablement à cette greffe, une irradiation corporelle totale est nécessaire afin de détruire les cellules tumorales. Ces patients traités par radiothérapie peuvent développer des séquelles de certains organes liées à l'irradiation et notamment des lésions au niveau des reins. Le but du projet est de comprendre le rôle d'un phénomène particulier appelé « sénescence » (qui correspond à un vieillissement cellulaire prématuré) dans l'initiation et le développement des lésions radio-induites rénales. Pour comprendre de manière intégrée et fiable ces mécanismes, nous devons utiliser des modèles expérimentaux précliniques *in vivo*. La lésion tissulaire rénale sera réalisée soit après une irradiation corporelle totale, soit après une irradiation localisée d'un rein. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques et qui permet par l'utilisation de lignées transgéniques d'étudier les mécanismes à l'échelle d'un organisme entier. Pour ce projet en particulier, la sénescence pourra être suivie *in vivo* grâce à l'utilisation de souris transgéniques permettant de suivre par imagerie l'apparition de ces cellules sénescents dans le cadre d'une collaboration. De plus, nous nous intéresserons à un marqueur et acteur de la sénescence *PAI-1* en utilisant des souris transgéniques n'exprimant pas du tout cette protéine (KO total) ou ne l'exprimant pas exclusivement au niveau de l'endothélium (*PAI-1 KO endo*).

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables statistiquement. Le nombre de souris prévues pour ce protocole est de 360.

Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (mise en place de grilles de score, suivi des animaux).

Dans le cadre d'une collaboration, ce projet aura lieu sur notre site, et certains animaux seront transférés dans un autre établissement utilisateur pour un second projet, une fois que leur état général aura retrouvé un niveau satisfaisant. Un projet pour la seconde partie sera déposé par le second établissement.

6229. Les hormones glucocorticoïdes (dont le cortisol) interviennent à différents niveaux sur le corps humain en particulier sur la régulation de l'immunité, le métabolisme glucidique, la régulation du stress.

Le métabolisme des hormones glucocorticoïdes est sous la dépendance d'une enzyme, dont le rôle est de convertir le cortisol (composé actif) en cortisone (composé inactif) au sein des cellules rénales. Cependant, les mécanismes contrôlant la régulation de cette enzyme restent mal connus et plusieurs situations pathologiques nous ont conduits à émettre l'hypothèse qu'un des modes de régulation de cette enzyme pourrait être lié aux hormones thyroïdiennes.

L'utilisation du modèle animal permet une étude des phénomènes mis en jeu en physiologie et en situation pathologique et sera complémentaire des autres études que nous mènerons sur le modèle cellulaire (analyses moléculaires) et en pathologie humaine. Nous allons utiliser le modèle murin pour tester notre hypothèse. Trois groupes de 10 souris (soit 30 souris au total) seront utilisées pour le projet, un groupe en hypothyroïdie (via l'administration durant 3 semaines dans l'eau de boisson d'un traitement visant à abaisser le taux d'hormones thyroïdiennes, un groupe en hyperthyroïdie (via l'administration durant 3 semaines d'hormones thyroïdiennes dans l'eau de boisson), un troisième groupe contrôle. L'analyse de l'expression et de l'activité de l'enzyme seront effectuées en fin de traitement.

Le choix de 10 souris par groupe permettra des analyses statistiques. L'administration des traitements dans l'eau de boisson minimise l'angoisse des animaux. Les souris disposent d'enrichissement tel que des maisons en cartons et des copeaux de bois pour faire des nids, raffinant ainsi leurs conditions de vie.

6230. Depuis quelques années, des études scientifiques ont mis en évidence des effets du microbiote intestinal (ensemble des microorganismes résidents ou en transit dans l'intestin) sur la santé de son hôte. Ces effets sont extrêmement variés et peuvent s'exprimer au niveau local (effet barrière, confort intestinal, maladie inflammatoire chronique de l'intestin, etc. ...) mais aussi au niveau périphérique (immunité, syndrome métabolique, comportement alimentaire, etc.). Les effets du microbiote intestinal sur la santé de l'hôte semblent être variables en fonction de sa composition et de ses activités.

Depuis plus de quinze ans, nous étudions les effets des protéines, variables en quantité et en qualité, sur la santé de l'intestin, le métabolisme et le comportement alimentaire. D'une façon générale, la nature et la quantité des aliments ingérés influencent la composition et les activités du microbiote intestinal, c'est pourquoi nous nous intéressons aux interactions entre les protéines de l'alimentation, le microbiote intestinal et la santé de l'hôte.

Il n'existe pas à ce jour de bon modèle *in vitro* pour les études concernant les interactions entre le microbiote intestinal et l'hôte. Cette expérimentation sera donc menée sur un modèle rongeur (Rat). Son but est d'évaluer les effets de divers régimes alimentaires variables en quantité et en qualité de protéines par rapport à une alimentation standard (contrôle) sur la diversité du microbiote intestinal tant au niveau qualitatif que quantitatif, sur ses activités métaboliques et sur les effets sur l'hôte. Dans ce cadre seront aussi étudiés les échanges de métabolites entre microbiote et muqueuse du côlon ainsi que les changements morphologiques et fonctionnels des colonocytes (cellules épithéliales du côlon) des différentes parties du côlon chez le rat (cæcum, côlon proximal, côlon médian et côlon distal).

Ce protocole sera utilisé dans le cadre des activités de recherche (études précliniques visant à établir des recommandations nutritionnelles pour la prévention de pathologies humaines), et d'enseignement dans le cadre de la formation expérimentale d'étudiants de Master 2. L'objectif de ces travaux pratiques est d'initier les étudiants à la microbiologie du tube digestif et à la physiologie digestive et métabolique. Le nombre d'animaux est de 16 pour cette séquence d'enseignement qui a lieu une fois par an, soit un total de 80 animaux sur cinq ans. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum exigé pour l'analyse statistique des résultats.

Les animaux seront des rats *WISTAR* mâles âgés au minimum de sept semaines, les rats de réforme (rats préalablement utilisés dans des protocoles sans sévérité) seront privilégiés. Quelle que soit leurs origines, les animaux suivront une période d'adaptation d'une semaine à leur nouvel environnement. Ils seront logés en cages individuelles, enrichies avec des tubes en cartons et présentant des parois transparentes leur permettant de voir leurs congénères. Ces dispositions permettront de diminuer le stress potentiel des animaux et agrémenteront leur séjour en cage. Ils seront manipulés et pesés tous les deux jours dès le début de la période d'adaptation.

Après cette semaine d'adaptation, les animaux seront placés aléatoirement soit dans un groupe nourri avec un régime expérimental (variable en qualité et/ou en quantité de protéines), soit dans le groupe contrôle (nourri avec un régime témoin normo-protéique). Cette phase expérimentale durera 15 jours puis les rats seront euthanasiés par un animalier expérimenté au moyen d'une injection péritonéale létale de pentobarbital sodique. Ces expériences nécessitent le prélèvement intégral du côlon et du contenu colique sur quatre segments différents, cæcum, côlon proximal, côlon médian, côlon distal afin d'effectuer des analyses. Des prélèvements d'autres tissus (sang, tissu adipeux) et d'autres organes (foie, pancréas) seront effectués. Ils permettront de faire des analyses complémentaires avec l'objectif de mettre en évidence des corrélations entre la composition et les activités du microbiote et le métabolisme de l'hôte. Les données obtenues permettront une mutualisation entre l'enseignement et les équipes de recherche de notre unité.

Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Les conditions expérimentales ne sont pas susceptibles d'entraîner de douleur et la qualification des expérimentateurs permet d'éviter toute douleur lors des manipulations liées à l'entretien des animaux.

6231. La tétraploïdie est une aberration génétique survenant dans les premiers stades du cancer. Cette modification conduit à la formation de cellules ayant doublé leur nombre de chromosomes et qui sont dans un état intermédiaire entre la diploïdie (cellules avec un contenu en chromosomes normal) et l'aneuploïdie (cellules qui ne possèdent pas le nombre normal de chromosomes) caractéristique des cellules tumorales de mauvais pronostic. Nous avons démontré que les cellules hyperploïdes (cellules avec

plus de chromosomes que la normale) cancéreuses sont plus résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie comparativement aux cellules diploïdes cancéreuses. De plus, nous avons prouvé que le système immunitaire peut reconnaître et détruire les cellules hyperploïdes, empêchant ces cellules génératrices de cancer de se propager et de générer des cellules aneuploïdes. Néanmoins, les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans cette reconnaissance ne sont pas encore élucidés. Ce protocole vise à déterminer les facteurs moléculaires qui provoquent la reconnaissance des cellules cancéreuses hyperploïdes par le système immunitaire. Nous étudierons les peptides qui, liés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I, un système moléculaire appartenant au système immunitaire de reconnaissance du soi) à la surface, peuvent rendre les cellules hyperploïdes immunogènes. Pour cela nous allons utiliser un modèle de vaccination peptidique contre ces cellules. Ces expériences consistent en une vaccination contre la greffe des cellules hyperploïdes de lymphome murin *in vivo* chez les souris immunocompétentes. Elles nécessitent le recours à un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur et une reconnaissance des cellules par le système immunitaire ; malheureusement aujourd'hui, du fait de sa complexité, il est impossible de reconstituer un système immunitaire *ex-vivo*.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement.

Ce projet nécessitera au maximum 304 souris. Ce nombre d'animaux se justifie par le nombre de peptides à étudier. Les groupes seront constitués par un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de souris par lot a été calculé par des méthodes de calcul de puissance (avec un seuil de 4% et une puissance de 95%). Enfin, nous pourrions réduire le nombre de souris dès les résultats significatifs seront obtenus. De plus, nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles.

Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Afin de soulager l'inconfort, et l'angoisse que les souris peuvent subir au moment des injections sous-cutanées, nous allons les anesthésier à l'isoflurane. La stabulation des animaux sera conventionnelle et ils recevront un régime alimentaire normal. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'angoisse (l'environnement sera constamment enrichi par des cocoon et des maisons en cartons).

6232. La cystite interstitielle est une maladie rare de la vessie très invalidante appelée désormais Syndrome de la vessie douloureuse. Elle ne doit pas être confondue avec la cystite dite classique qui est une infection urinaire causée par des bactéries. La cystite interstitielle est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par des envies fréquentes et anormales d'uriner, et par des douleurs importantes dans le bas ventre. Ces douleurs et ces envies d'uriner sont souvent très intenses, voir insupportables, au point qu'elles peuvent constituer un véritable handicap social, empêchant les personnes de sortir de chez elles. La sévérité des symptômes est variable d'une personne à l'autre. Il est difficile de connaître le nombre exact de personnes atteintes par cette maladie car elle est sous-diagnostiquée. On estime qu'il existe entre 1 et 7 cas pour 10 000 individus en Europe et 1 cas pour 1 500 individus aux Etats-Unis. Cette maladie touche principalement les femmes qui représentent 90 % des personnes atteintes. Elle est diagnostiquée généralement entre 30 et 40 ans et 25% des patients sont âgés de moins de 30 ans.

Les causes ne sont pas encore élucidées, mais, parmi toutes les hypothèses, la plus étayée est celle de l'altération de la perméabilité de la paroi de la vessie. La surface de la paroi est normalement tapissée par une couche de mucus agissant comme une barrière protégeant la muqueuse des composés agressifs et toxiques contenus dans les urines. Cette couche protectrice est altérée chez 70% des personnes atteintes de cystite interstitielle. Les produits toxiques pourraient donc franchir la paroi de la vessie, provoquer une inflammation et déclencher la maladie.

Pour l'instant, on ne dispose pas de traitement curatif contre cette affection. La plupart des traitements existants sont basés sur l'administration de médicaments atténuant ou diminuant les symptômes pour améliorer la qualité de vie des patients.

La théorie de la perméabilité de la paroi de la vessie a permis l'arrivée de nouveaux traitements qui agissent directement sur la paroi de la vessie en réparant la couche superficielle intérieure. Ils sont administrés directement dans la vessie par une sonde urétrale. Des études cliniques et précliniques ont prouvé une efficacité très importante de ces composés. Néanmoins, ils présentent des limitations et des contraintes importantes : une dégradation rapide du médicament conduisant à des concentrations locales très faibles, un temps de résidence dans la vessie assez court dû aux mictions répétées et des administrations douloureuses pour le patient.

Le but de ce projet est de développer de nouvelles formulations galéniques de type nanoparticules qui sont des médicaments de taille nanométrique (millardième de mètre) qui permettraient d'améliorer la rétention et l'adhésion de la substance active au niveau de la paroi de la vessie. Ce médicament issu des nanotechnologies renfermera une substance active et sera sous une forme non-sphérique et aplatie que nous appellerons plaquettes. Le principe actif agirait en tant que substance active et en tant que véhicule du médicament. En effet, la forme du système nanoparticulaire jouera un rôle indispensable sur le devenir *in vivo* du médicament, les nanosphères sphériques étant éliminés rapidement avec le flux d'urine alors que les nanoplaquettes du fait de leur forme aplatie seraient préférentiellement dirigées vers la paroi et resteraient dans la vessie. Des modèles mathématiques ont prouvé que la probabilité d'adhésion ainsi que la mobilité des nanoplaquettes est différente de celles des objets sphériques. Ces hypothèses ont été vérifiées par nos expériences biophysiques et nos études *ex vivo*.

Nous souhaitons maintenant vérifier *in vivo*, sur un modèle de cystite interstitielle aiguë et chronique, que les nanoplaquettes, grâce à leur forme, auraient une mobilité dirigée dans l'urine qui permettrait une meilleure interaction et adhésion avec les cellules de la paroi de la vessie. La simple possibilité de concentrer les substances thérapeutiques à la surface de la paroi représenterait déjà à elle seule un progrès considérable par rapport à la pratique clinique actuelle. L'objectif final de ce travail est d'étudier l'accumulation et la distribution du nanomédicament dans l'organisme ainsi que d'évaluer son efficacité thérapeutique après administration dans la vessie.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R :

Ces études *in vivo* sont indispensables à ce stade de l'étude car, jusqu'à présent il n'est pas possible de reproduire exactement la complexité d'un organisme entier en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles mathématiques, notamment les phénomènes de dégradation des principes actifs et de miction dans notre cas. Des modèles pathologiques du Syndrome de la vessie douloureuse chez les rats sont parfaitement décrits dans la littérature scientifique. Nous utiliserons pour ces études *in vivo* un maximum de 1194 rats sur 5 ans. Les nanoparticules seront testées au préalable *in vitro* sur des cultures cellulaires pour évaluer leur toxicité et toutes les études préliminaires ont été faites *ex vivo* sur des vessies prélevées sur des rats euthanasiés (raffinement dans le cadre de l'optimisation). Les études d'accumulation et de distribution seront réalisées en imagerie ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expériences seront aussi raffinées en veillant à réduire au maximum la douleur, souffrance ou angoisse des animaux lors de l'étude avec l'utilisation d'anesthésique et d'analgésique lorsque c'est nécessaire.

6233. Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) sont des maladies hématologiques caractérisées par une production exagérée et incontrôlée de globules rouges, plaquettes ou globules blancs. Ils ont une évolution fatale à plus ou moins long terme et restent sans traitement spécifique curatif. Ils sont dus à une « mutation dite initiatrice », principalement la mutation « *JAK2V617F* », survenant au niveau d'une cellule « souche » située dans la moelle osseuse et à l'origine des cellules du sang. Les NMP s'aggravent à cause de « mutations dites additionnelles ». Notre équipe a développé une souris présentant la mutation initiatrice *JAK2V617F* et montré que la « souris *JAK2V617F* » présentait une maladie identique aux NMP humaines et répondait de façon identique aux patients à deux médicaments, un inhibiteur de JAK2 et l'interféron, en faisant un modèle préclinique de valeur pour tester de nouvelles thérapies dans ces maladies.

Les buts de ce projet sont de :

- (1) tester de nouveaux médicaments dans notre modèle de « souris *JAK2V617F* »,
- (2) développer des maladies plus graves chez cette « souris *JAK2V617F* » en associant la mutation *JAK2V617F* à ces « mutations additionnelles » pour comprendre les mécanismes d'aggravation des NMP et tester des médicaments dans ces formes sévères réfractaires aux thérapies actuelles qui posent un problème de santé publique.

Nous testerons des médicaments qui pourraient synergiser leur pouvoir curatif : interféron, arsenic, inhibiteur de JAK2 et hydroxyurée. Nous espérons à la fin de cette étude développer chez l'homme un nouveau traitement dans ces maladies, principalement dans les formes les plus évoluées. Pour cela, nous sommes certains que les modèles de NMP murins, si fidèles aux NMP humains, nous apporteront l'éclairage suffisant. Ces modèles, par leur fidélité à la situation de la maladie humaine, ont une très grande valeur ajoutée pour la compréhension de ces maladies et leur traitement.

L'utilisation d'animaux est incontournable car nous essayons de savoir si les mutations survenant dans des cellules souches hématopoïétiques miment les symptômes hématologiques observés chez les patients atteints de NMP et si ces symptômes chez l'animal peuvent être traités par des médicaments, auquel cas on peut espérer les appliquer aux patients souffrant des mêmes symptômes. Il s'agit donc d'analyser l'organisme dans sa globalité incluant ses paramètres hématologiques complexes et sa survie. Les expériences *in vitro* ne peuvent pas reproduire l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques, base de la résistance et dominance clonale des cancers, mais reproduisent seulement la différenciation et prolifération partielles de ces cellules. Les analyses *in vitro* sur l'efficacité des médicaments ne peuvent donc qu'être partielles. Par ailleurs, il est difficile d'avoir des cohortes d'animaux identiques car la maladie évolue avec l'âge. Pour contrer cela, nous utiliserons la transplantation médullaire. En effet, la maladie est transplantable et identique à elle-même par greffe de moelle osseuse dans des souris receveuses. Ce système nous permet donc de générer de nombreux (jusqu'à 25 par donneur) animaux receveurs ayant une maladie identique au même stade d'évolution. Cette méthode de transplantation permet aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés par rapport à l'utilisation unique d'animaux génétiquement modifiés, et aussi du fait d'obtenir de façon synchrone et bien reproductible un groupe de modèles pour les tests de pistes thérapeutiques. Pour ce projet de 5 ans, nous avons prévu d'utiliser au maximum 846 souris.

Toutes les procédures seront faites sous anesthésie générale ou locale. Les modèles animaux seront suivis attentivement, avec des points limites spécifiques, comme l'hématocrite.

6234. Le déoxynivalenol (DON), également appelé vomitoxine, est un métabolite secondaire des champignons de type *Fusarium*. C'est l'une des mycotoxines les plus abondantes associée à la production des céréales et des aliments à l'échelle mondiale. Une enquête réalisée par l'autorité européenne de la sécurité des aliments a récemment mis en évidence l'exposition chronique des humains au travers de leur régime alimentaire. En effet, 90 % des participants à l'étude avaient des niveaux de DON significatifs dans les urines (EFSA 2015). Une autre étude du comité scientifique norvégien pour la sécurité alimentaire a mis en évidence que l'exposition des enfants au DON atteint ou dépasse la limite journalière autorisée (JECFA 2011). De plus, les animaux domestiques et les poissons sont également sensibles au DON, d'où des limites maximales fixées par l'Union Européenne concernant sa présence dans l'alimentation. Les effets d'une intoxication aiguë par le DON incluent une atteinte du système immunitaire, une inflammation gastro-intestinale et centrale et un état anorexique. Des travaux sur les rongeurs et les animaux domestiques suggèrent en outre une action directe sur le système nerveux central. Aucune étude n'a cependant examiné l'impact d'une consommation chronique de faibles doses de DON sur le fonctionnement du cerveau. En particulier, aucune étude n'a abordé l'impact de l'administration chronique de faibles doses de DON sur le système opioïde. Ce dernier, outre son impact dans le cadre de la prise alimentaire, régule un grand nombre de fonctions physiologiques et sa dérégulation contribue aux situations pathologiques telles que douleur ou désordres psychiatriques.

Nous proposons une étude multimodale alliant analyse moléculaire et comportement animal afin d'identifier la toxicité d'un traitement chronique au DON sur l'activité neuronale et son impact sur la perception de la douleur et l'état anxio-dépressif de l'animal. Nous utiliserons comme modèles murins des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées exprimant les récepteurs opioïdes mu et delta en fusion avec une protéine fluorescente respectivement rouge ou verte, qui permettent leur visualisation directement dans le système nerveux. Nous anticipons que, dans son ensemble, ce projet nécessitera 252 souris. Il sera conduit en respectant la règle des 3R visant à optimiser les procédures et à remplacer ou réduire dès que possible le nombre d'animaux d'expérience. En effet, le projet comporte 11 procédures expérimentales qui seront combinées pour utiliser les mêmes animaux pour les tests comportementaux et ainsi limiter considérablement le nombre d'animaux nécessaire. Les animaux sont hébergés en condition enrichie. Nous essayerons également de substituer au gavage une administration du DON dans l'eau de boisson, condition moins stressante pour l'animal.

6235. Dans l'espèce caprine, les femelles atteignent la puberté vers l'âge de 6-7 mois. Néanmoins, nous savons que chez de nombreuses espèces animales, les interactions sociales peuvent jouer un rôle crucial dans la régulation de la physiologie et des comportements reproducteurs. Ainsi, des travaux effectués précédemment au sein de l'équipe de recherche sur la souris ont montré que l'exposition de femelles impubères au mâle permettait d'induire une apparition précoce de la puberté chez ces animaux. Ces travaux ont également démontré que cette induction de la puberté par la présence du mâle était possible chez les caprins. Dans le cadre de cette première expérience, les jeunes chevrettes étaient exposées de manière continue au bouc au travers d'une barrière et 3 fois par semaine, le bouc était mis en contact direct avec les femelles pour maximiser la stimulation.

Nous voudrions donc tester la possibilité d'induire une puberté précoce chez les chevrettes en les exposant aux signaux sensoriels des mâles mais sans permettre une interaction directe entre ces derniers. Cela permettrait à terme de proposer des applications pratiques dans le champ des productions animales (raccourcissement de la période précédant la première reproduction), faciles à mettre en place pour les éleveurs et sans avoir recours aux traitements hormonaux. Lors d'une première expérience nous avons pu obtenir une accélération de la puberté, nos femelles pesaient en moyenne 32 Kg à la première ovulation, ce qui est en général le poids requis pour la mise en reproduction en race alpine (selon les recommandations de l'Institut de l'Élevage). De plus, dans les élevages caprins, chaque femelle n'ayant pas eu de petits lors de sa première année de vie, engage un surcoût mensuel non négligeable. Notre protocole permettrait d'induire la puberté chez les femelles dont la première ovulation se déclarerait de manière tardive, évitant ainsi la mise en réforme de ces jeunes femelles. Notre étude a donc un intérêt à la fois économique et sanitaire.

Ainsi nous utiliserons 12 chèvres et 4 boucs. Pour évaluer l'impact de l'exposition péri-pubertaire au mâle, les femelles après le sevrage seront divisées en 2 groupes, un groupe contrôle non exposé aux mâles et un groupe exposé aux mâles entiers, de l'âge de 3 mois à 8 mois (juin à décembre 2017). L'exposition sera continue au travers d'une barrière ajourée afin de permettre aux femelles de voir le mâle, de l'entendre et de le sentir. L'état physiologique des femelles sera suivi par des dosages de progestérone qui permettront de savoir si elles ont ovulé ou non. La plupart des procédures utilisées dans ce protocole sont soit des procédures d'élevage soit des procédures peu invasives et tous les animaux pourront réintégrer le troupeau à la fin de l'expérience.

Ce projet respecte la règle des 3R:

- Remplacement : Le modèle animal ne peut pas être remplacé dans ce projet étudiant l'impact de relations socio-sexuelles sur la puberté, ceci ne pouvant être modélisés par des modèles alternatifs.
- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés (12 femelles et 4 mâles) a été rationalisé afin de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire tout en permettant la mise en évidence d'un effet significatif après analyse statistique.
- Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupes sur paille et bénéficieront d'enrichissement comme des caisses en bois pour grimper dessus et des ballons.

6236. L'hypertension et l'insuffisance cardiaque représentent des pathologies majeures dans les pays développés. Le traitement de l'hypertension artérielle nécessite l'administration de 2 voire 3 médicaments, cependant certains patients ne répondent toujours pas au traitement. La recherche d'un nouveau type de médicaments anti-hypertenseurs est donc une nécessité. L'aminopeptidase A (APA) est une enzyme responsable de la conversion de l'angiotensine II en angiotensine III dans le cerveau. De nombreuses études ont montré que l'angiotensine III cérébrale exerce un effet stimulateur tonique sur le contrôle de la pression artérielle chez le rat hypertendu. En effet, l'administration d'un inhibiteur de l'APA par voie orale dans différents modèles expérimentaux d'hypertension, entraîne une normalisation de l'hyperactivité de l'APA cérébrale et une baisse soutenue de la pression artérielle. Chez un animal ayant une tension artérielle normale, l'inhibiteur n'entraîne pas la baisse de la pression artérielle montrant qu'il agit comme un antihypertenseur à action centrale et non comme un hypotenseur. Un traitement de l'hypertension, basé sur l'inhibition de l'APA, est actuellement en essai clinique chez le patient hypertendu.

Après un infarctus du myocarde (IM), divers mécanismes contribuent au remodelage et au dysfonctionnement progressif du cœur : dilatation progressive du ventricule gauche, fibrose et diminution de la performance contractile du myocarde. On constate également une augmentation de l'activité des neurones angiotensinergiques (SRA cérébral) qui s'est révélée être responsable de l'hyperactivité des voies sympathiques et de l'activation des SRAs systémique et cardiaque. Nous avons fait l'hypothèse qu'un traitement par un inhibiteur bloquant l'activité du SRA cérébral, devrait prévenir l'insuffisance cardiaque après un IM. Les premiers résultats montrent qu'après un IM chez le rat, une augmentation de l'activité APA cérébrale, qui participe à l'hyperactivité du SRA cérébral, est observée dans ce modèle. Après un IM, l'injection chronique pendant 28 jours par voie centrale d'un inhibiteur de l'APA, normalise l'activité APA au niveau des animaux contrôles. Ceci a pour conséquence de normaliser l'activité du SRA cérébral, ainsi que le tonus sympathique, et d'améliorer la fonction cardiaque.

Dans l'objectif d'une application clinique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, ce projet vise à démontrer l'intérêt thérapeutique d'un inhibiteur de l'aminopeptidase A, administré par voie orale, dans la prévention/traitement de l'insuffisance cardiaque. Différents inhibiteurs de l'aminopeptidase A seront testés. L'administration du produit se fera par voie orale chez la souris atteinte d'insuffisance cardiaque.

Ces tests pharmacologiques s'inscrivent dans le cadre d'une phase préclinique d'un nouveau traitement de l'insuffisance cardiaque chez l'Homme. Il est, par conséquent, indispensable de mener ces études sur un modèle reproduisant la pathologie de manière fidèle au niveau d'un organisme entier (Remplacement). Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation du protocole d'induction des infarctus du myocarde chez la souris. Afin d'optimiser le nombre d'animaux, une étude statistique préalable a été réalisée et a permis de définir le nombre total de 416 animaux. Des études *in vitro* préliminaires ont été menées pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire au projet (Réduction). La procédure d'obtention du modèle d'insuffisance cardiaque sera réalisée par des personnes habilitées à le faire tout en respectant le bien-être animal. Pour éviter toute souffrance, la procédure chirurgicale sera réalisée sous anesthésie générale (kétamine-xylazine) avec administration d'un antalgique (méloxicam). Si une souffrance est détectée, l'administration d'un morphinique (buprénorphine) sera réalisée. Un suivi régulier des animaux pendant et 72h après la chirurgie sera effectué. Les animaux seront placés dans un environnement calme, propre et enrichi. Les échographies seront effectuées sous anesthésie gazeuse (isoflurane) pour réduire le stress de l'animal (Raffinement).

6237. Les thérapies anticancéreuses consistant à activer le système immunitaire (immunothérapie) ont démontré leur efficacité dans plusieurs cancers tels que le cancer de la peau, le cancer du poumon ou encore le cancer du rein. En effet, l'anti-PD1 est une immunothérapie qui permet une réinduction de la réponse immunitaire anti-tumorale qui est supprimée par les cellules cancéreuses, mais nous ignorons les voies cellulaires et moléculaires impliquées. C'est pourquoi, nous souhaitons déterminer le mécanisme d'action de cette thérapie.

De plus, l'anti-PD1 n'est efficace que chez 15 à 30% des patients d'où la nécessité de trouver les raisons pour lesquelles certains patients répondent au traitement et d'autres pas. La découverte du mécanisme d'action pourra nous permettre de répondre à cette interrogation mais également de déterminer si on peut combiner l'anti-PD1 avec d'autres traitements pour les patients non répondeurs.

Pour cela, les souris seront implantées avec une tumeur puis traitées avec l'anti-PD1. Ainsi, nous allons tester plusieurs types de tumeurs afin de déterminer leur résistance à l'anti-PD1. Afin de déterminer la voie cellulaire impliquée dans la résistance à l'anti-PD1, nous utiliserons des cellules tumorales ou des souris n'exprimant pas certaines protéines (impliquées dans différentes voies cellulaires). Enfin, les souris porteuses de tumeurs seront traitées avec l'anti-PD1 combiné à d'autres traitements inhibant les voies cellulaires susceptibles d'être impliquées dans la résistance à l'anti-PD1 et ainsi augmenter son efficacité.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire hors d'un organisme vivant du fait de sa complexité. Le projet nécessitera 3556 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par le nombre de cellules tumorales à tester, les différentes voies cellulaires étudiées et les différentes combinaisons de traitements.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats. Afin de diminuer le nombre d'animaux, des expériences de culture cellulaire ont été réalisées afin de sélectionner au préalable les voies cellulaires pouvant être impliquées dans la résistance à l'anti-PD1. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les animaux seront dans un environnement enrichi pour diminuer le stress, un anesthésiant local sera appliqué à chaque injection pour la douleur et leur état de santé sera surveillé quotidiennement.

6238. Dans l'élevage caprin, afin de permettre une production tout au long de l'année, les animaux sont mis en reproduction à contre-saison, c'est-à-dire en mars/avril au lieu de septembre/octobre. Afin d'avoir des femelles réceptives à cette période de l'année, les éleveurs utilisent des traitements hormonaux comme la pose d'éponges à progestagènes conjuguée à une injection de prostaglandines. La demande actuelle des consommateurs est de diminuer voire éliminer complètement les traitements hormonaux en agriculture.

Ces traitements hormonaux sont également réalisés sur les jeunes chevrettes de 7 mois, nées en septembre, qui n'entrent en puberté spontanée qu'à l'âge de 1 an environ. En effet, chez les caprins, les petits naissent classiquement au printemps et sont pubères autour de l'âge de 6-7 mois. Néanmoins lorsque les femelles sont mise en reproduction à contre-saison (au printemps plutôt qu'à l'automne), les petits naissent en décalé, en septembre /octobre au lieu de mars/avril. Il est connu que les chevrettes qui naissent en décalé présentent une puberté retardée (à 1 an) par rapport aux chevrettes nées de manière classique, ce qui représente une perte de production importante en élevage.

Il est connu que chez de nombreuses espèces de mammifères, les signaux socio-sexuels échangés au cours des interactions entre les sexes jouent un rôle important dans la régulation de la physiologie et des comportements reproducteurs. Ainsi des travaux précédents que nous avons réalisés ont montré la possibilité d'induire une puberté précoce chez la chevrete en l'exposant de manière précoce et continue à un mâle adulte.

Le but de notre étude est de contrer ce retard de puberté chez des chevrettes nées en décalé, sans utilisation de traitement hormonal, mais simplement par une exposition continue à des boucs sexuellement actifs. Notre étude a donc un intérêt à la fois économique et sanitaire.

Pour cela nous utiliserons 18 chèvres et 12 boucs. Les chèvres seront mises en présence des mâles après leur sevrage, dès l'âge de 3 mois. L'importance du niveau d'activité sexuelle du bouc pour l'induction de l'ovulation chez des femelles en repos sexuel est bien connue ; ainsi nous allons utiliser des boucs sexuellement actifs pour stimuler nos femelles.

Nous aurons donc besoin de mâles sexuellement actifs en contre-saison, les mâles seront alors soumis à un traitement lumineux. En effet chez les caprins la reproduction est sous contrôle photopériodique (durée du jour), les animaux sont sexuellement actifs en jours courts (hiver: généralement plus de 14-16h de nuit pour 10-8h de jour). Un traitement photopériodique de jours longs permet de mimer la saison d'inactivité sexuelle et le passage ensuite en jours courts correspond à une transition jours longs-jours courts permettant ainsi d'activer l'axe reproducteur mâle. Le passage en jours courts peut être réalisé par une exposition à la photopériode naturelle ou par la pose d'implants de mélatonine lorsque cela est nécessaire (durée naturelle du jour trop longue pour permettre un effet du traitement). La libération de mélatonine par l'implant permettra de mimer les jours courts, cette hormone n'étant normalement sécrétée que la nuit. La quantité de mélatonine est donc corrélée à la durée de la nuit. La plupart des procédures utilisées dans ce protocole sont soit des procédures d'élevage soit des procédures peu invasives et tous les animaux pourront réintégrer le troupeau à la fin de l'expérience.

Ce projet respecte la règle des 3R:

- Remplacement : Le modèle animal ne peut pas être remplacé dans ce projet étudiant l'impact de relations socio-sexuelles sur la puberté, ceci ne pouvant être modélisés par des modèles alternatifs.
- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés (18 femelles et 12 mâles) a été rationalisé afin de ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire tout en permettant la mise en évidence d'un effet significatif après analyse statistique.
- Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupes sur paille et bénéficieront d'enrichissement comme des caisses en bois pour grimper dessus et des ballons.

#### 6239. 1-Objectif scientifique du projet:

*Francisella tularensis* est une bactérie responsable de la tularémie. La tularémie est une zoonose, c'est-à-dire qu'elle est transmise à l'homme par contact avec un animal infecté. *Francisella* est un pathogène intracellulaire qui possède un tropisme naturel vers les macrophages et utilise ces cellules pour se répliquer. Le système immunitaire inné est capable de détecter la bactérie, grâce aux protéines de l'inflammasome, et d'activer une réponse inflammatoire. L'objectif de ce projet est de valider *in vivo* dans un modèle murin de tularémie, des résultats *in vitro* montrant un rôle prépondérant des protéines induites par l'interféron dans l'activation de l'inflammasome mais aussi dans la clairance bactérienne.

#### 2- Retombées attendues

Ce projet devrait permettre de caractériser le lien entre les protéines induites par l'interféron et l'inflammasome dans la tularémie. De manière plus globale, les résultats permettront une meilleure compréhension des mécanismes de l'immunité innée contre les pathogènes intracellulaires.

#### 3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Les questions posées ici nécessitent un système complexe d'interactions entre plusieurs cellules immunitaires, et ne peuvent donc pas être investiguées dans des modèles *in vitro* ou dans des modèles *in vivo* utilisant des animaux invertébrés. La souris est donc un excellent modèle pour étudier le système immunitaire, d'une part parce qu'il se rapproche de celui de l'homme et d'autre part car des souris KO spécifiques de ce système sont disponibles. De plus, la souris est un excellent modèle de la tularémie. De nombreux paramètres de l'hôte et de la bactérie seront étudiés sur chaque animal pour réduire au maximum le nombre de répétitions expérimentales. Le nombre de souris utilisées permettra d'établir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre total d'animaux inclus dans ce projet est de 256 souris.

Le bien-être des animaux sera respecté pendant les procédures et son maintien sera vérifié par l'établissement et la détection de points-limites.

6240. Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans le monde et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est un challenge majeur. La voie Notch a été montrée comme nécessaire dans la progression des tumeurs pulmonaires induites par les oncogènes KRAS, EGFR et ALK. Nous désirons savoir si l'inhibition de cette voie en association avec des thérapies actuellement utilisées améliorerait le traitement de ce type de tumeur.

Afin de mimer au maximum les conditions physiologiques, nous allons mettre au point des greffes orthotopiques d'échantillons de tumeurs issues des patients dans des souris. La greffe orthotopique signifie que la greffe est réalisée au niveau du site d'origine de la tumeur primaire et donc dans ce cas-ci au niveau du poumon, contrairement à l'implantation sous-cutanée classiquement utilisée dans ce type de modèle.

Le Principe des 3 R sera respecté. L'environnement de la tumeur étant important dans sa croissance, les études *in vitro*, bien que préalables, ne sont pas suffisantes pour étudier l'effet de nouveaux traitements. La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris athymique, c'est-à-dire dépourvues de thymus et donc présentant une déficience du système immunitaire.

Le nombre d'animaux pour chaque traitement a été déterminé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en nous permettant de réaliser des études statistiques valables. Pour ce projet, 2090 souris seront nécessaires. Le bien-être animal est assuré en utilisant des cages d'une superficie de 483 cm<sup>2</sup>. La litière est un mélange de litière et de copeaux de peuplier. L'enrichissement des cages se fait avec des briques de peuplier ou des carrés de cellulose.

6241. L'épilepsie temporale est une maladie chronique et neurodégénérative dont le mécanisme reste mal compris. Pour certaines formes de cette maladie, les médicaments disponibles restent inefficaces. Une neurochirurgie apparaît comme une solution de dernier recours mais dont l'efficacité n'est valable que dans certains cas. Pour l'instant, les modèles animaux les plus utilisés sont des modèles induits pharmacologiquement (exemple : injection de pilocarpine) ou par une stimulation électrique (« kindling »). Ces modèles présentent des lésions cérébrales qui ne sont pas pertinentes par rapport à celles qui sont rencontrées chez les patients. Il existe donc un besoin pour le développement de modèle animal présentant des lésions similaires aux patients épileptiques comme la sclérose de l'hippocampe associée à des convulsions. Récemment, une souris déficiente en protéine *Girdin* a été développée. La mutation est récessive. Ainsi, à l'état hétérozygote, la souris ne présente pas de phénotype épileptique. La souris homozygote pour la mutation (*Girdin KO*) présente des crises épileptiques associées à une sclérose d'hippocampe, sans lésion pour les autres régions du cerveau. La fréquence des crises épileptiques varie entre 4 et 15 par jour et apparaissent à partir de l'âge de 30 jours. Le modèle *Girdin KO* présente donc des caractéristiques pertinentes pour un modèle d'épilepsie temporale. Ce modèle permet d'étudier les effets à long terme de médicament sur le développement des convulsions et de la sclérose de l'hippocampe. Nous réalisons ce projet dans le cadre d'une prestation de service dont l'objectif est l'élevage et le maintien de la lignée de souris *Girdin KO* afin que notre client puisse recevoir le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ses études. Pour ce projet, un nombre de 500 souris sera utilisé. La règle de la réduction est ainsi appliquée avec la production d'un nombre d'animaux juste nécessaire à la réalisation des études. L'élevage de ces souris est assuré par un accouplement de mâles et femelles hétérozygotes pour la mutation. Les souris d'intérêt sont détectées par génotypage à partir d'un prélèvement issu d'une biopsie caudale réalisée à une semaine d'âge. Cela permet de détecter les souris homozygotes pour la mutation avant 2 semaines d'âge. En effet, la déficience totale de la protéine *Girdin* se révèle mortelle si les animaux reçoivent une alimentation standard autour de l'âge du sevrage ; les souris KO apparaissent trop faibles pour s'alimenter correctement avec un aliment solide et doivent recevoir un supplément alimentaire sous forme de gel nutritif autour de cet âge. Cette supplémentation sous forme de gel permet de limiter la perte de poids de ces souris qui retrouvent un poids normal vers l'âge de 2 à 3 mois et une espérance de vie semblable aux souris contrôles. La règle de raffinement est ainsi respectée. Le bien-être des animaux est également assuré par leurs conditions d'hébergement respectant leurs besoins physiologiques et la mise en place d'un enrichissement adapté. Les souris font également l'objet d'une surveillance quotidienne.

6242. Les maladies cardiovasculaires sont une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. Une des pathologies cardiaques encore mal soignées aujourd'hui est l'insuffisance cardiaque. Suite à un infarctus ou une hypertension, des mécanismes de compensation, tels que l'hypertrophie cardiaque se mettent en place. Cependant, ces mécanismes induisent également des altérations du muscle cardiaque qui conduisent à l'insuffisance cardiaque. L'hypertrophie cardiaque puis l'insuffisance cardiaque sont en partie dues à des modifications de l'expression des gènes. Dans les cellules, l'expression des gènes est le résultat d'interactions moléculaires complexes entre des séquences d'ADN et des protéines. Un facteur important régulant ces interactions est l'épigénétique. L'épigénétique regroupe l'ensemble des mécanismes transmissibles influençant l'expression des gènes sans altérer la séquence de l'ADN. Les acteurs moléculaires de l'épigénétique sont actuellement des nouvelles cibles thérapeutiques très prometteuses. Nos travaux actuels visent à identifier et caractériser ces acteurs moléculaires épigénétiques associés aux pathologies cardiaques, en particulier à l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque.

Dans ce but, nous utilisons des modèles murins dans lesquelles l'expression d'enzymes impliquées dans l'épigénétique est diminuée afin de tester l'implication physiopathologique de ces protéines. Dans le cadre de ce projet, l'application de la règle des 3R se décline comme suit :

Remplacement : Seul un système intégré, l'animal, peut reproduire les différentes composantes des pathologies humaines mimées. En effet, l'insuffisance cardiaque, est la conséquence d'un processus de remodelage cardiaque induit par de multiples systèmes (immunitaires, neuronaux, endocriniens, rénaux, ...) qui ne peuvent être étudiés que chez l'animal. De plus l'utilisation d'un mammifère permet une meilleure transposition vers la clinique dont le besoin de nouveaux traitements est urgent. Par ailleurs, les outils génétiques dont nous disposons ne sont présents que chez la souris. Ainsi, les expériences seront réalisées chez la souris en l'absence d'alternative possible.

Réduction : Chaque animal est utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, histologiques, biochimiques et moléculaires) du développement de la pathologie. Ainsi, le nombre d'animaux est réduit au nombre strictement nécessaire pour évaluer la dysfonction cardiaque et répondre à la question scientifique. Par ailleurs, ce projet est original ; l'implication des différentes enzymes épigénétiques étudiées n'a jusqu'à présent jamais été testée dans ces pathologies. Le projet qui étudie l'implication de 3 cibles épigénétiques nécessite l'utilisation de 288 animaux.

Raffinement : Pour éviter anxiété ou douleur, des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés. Il est à noter cependant, qu'en dehors de l'intervention chirurgicale, le développement de l'atteinte cardiaque n'est pas douloureux. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux est mis en place (comportement, état du pelage, isolement). De plus, le suivi régulier de la fonction cardiaque par imagerie permet d'estimer, avant même l'apparition des signes cliniques, d'identifier les animaux nécessitant une attention particulière. Toute intervention jugée nécessaire (soins, euthanasie) est réalisée par un personnel compétent. Les conditions d'hébergement correspondent aux standards réglementaires et les animaux organisés en groupes sociaux ont un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture.

6243. L'équipe s'intéresse au contrôle hormonal et/ou nutritionnel des sécrétions des cellules du tissu adipeux et leur implication dans les dysrégulations métaboliques associées à l'obésité (diabète, certaines maladies rares, le cancer, le vieillissement). Les



conditions de fonctionnement des tissus/organes peuvent être profondément altérées dans des situations d'adaptation physiologique (surcharge pondérale), de perte de fonctionnalité (insulino-résistance, inflammation, vieillissement) ou pathologiques (obésité, diabète, accumulation de lipides dans le foie (=stéatose)). Chacun des tissus clefs de la régulation énergétique (tissu adipeux, foie, muscle) sécrète des molécules (dites "tissu-kines") capables d'agir de façon locale ou dans le sang. Notre connaissance/expertise en matière de sécrétion/régulation et de réponse métabolique aux hormones, nous amène à explorer plus en amont les effets de nouvelles molécules bioactives capables d'interagir avec les récepteurs/systèmes de reconnaissance des "tissu-kines" et leurs potentielles capacités à contrer certains des désordres liés aux dysfonctions métaboliques. Tester les effets biologiques de ces molécules bioactives (d'origine naturelle ou synthétiques) et la régulation / modulation de leurs effets nous permet de proposer des cibles originales. Dans ce but, nous utilisons des animaux (souris mâles ou femelles car la différence de réponse au régime hypercalorique selon le sexe est à prendre en compte) dont l'alimentation permet une surcharge énergétique (régimes riches en graisse et/ou en sucre) entraînant la mise en place d'une obésité et le développement progressif de désordres de la régulation de la glycémie (résistance à l'insuline, diabète). De manière à évaluer l'efficacité de nouvelles molécules bioactives, ces dernières peuvent être administrées par voie orale, intra-péritonéale ou sous-cutanée. L'administration de ces molécules peut intervenir soit lors de la mise en place de l'obésité, en parallèle au régime (on parlera de molécule à action préventive) ou une fois la pathologie installée (on parlera de molécule à action curative). Divers paramètres physiologiques seront suivis de façon non invasive lors des expérimentations (prise de poids, mesure de la prise alimentaire/hydrique, pourcentage de masse grasse, comportement, activité physique...), dans certains cas une prise de sang de petit volume permettra de suivre des index métaboliques (glycémie et taux d'insuline dans le sang lors de tests fonctionnels). Enfin au sacrifice une étude précise des paramètres sanguins mais également tissulaires sera effectuée. De tels protocoles n'entraînent aucune souffrance animale car les animaux sont mis à mort avant que les désordres métaboliques provoqués n'engendrent une quelconque invalidité. Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe et de la durée des protocoles, des groupes de 8 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). L'ensemble du projet nécessitera au maximum 1104 souris (mâles et femelles), en comptant les mises au point des protocoles (choix de la dose par exemple). Nous travaillerons sur des souris adultes qui répondent bien au régime gras. Leur utilisation sera répartie sur différentes expérimentations : 6 molécules seront testées au cours des cinq prochaines années.

Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être des animaux pour limiter leur souffrance, leur douleur ou leur angoisse. Les souris seront hébergées par cage de 4, des carrés de ouate et des igloos seront placés dans les cages pour leur permettre de faire un nid et le cas échéant, diminuer leur agressivité. Les points limite préalablement définis tels qu'une perte de poids atteignant 20%, un comportement anormal grave, un arrêt d'alimentation et un mutisme de plus de 24 h conduiront à un arrêt d'urgence de l'expérimentation. L'observation quotidienne des animaux sera réalisée par du personnel qualifié de la zootechnie et de l'équipe de recherche.

6244. L'ostéosarcome est une tumeur osseuse maligne qui affecte principalement les adolescents et les adultes jeunes. Le traitement classique comprend une chirurgie agressive des lésions tumorales osseuses, associée à une chimiothérapie. Environ 15 à 20 % des patients porteurs d'ostéosarcome se présentent avec une maladie métastatique d'emblée, les métastases pulmonaires étant les plus fréquentes. Vingt-cinq à 50% des patients développent des métastases ultérieurement. Malgré les récents progrès des polychimiothérapies, les patients présentant un ostéosarcome métastatique ont une survie à long terme inférieure à 20%.

Comme dans de nombreux types de tumeurs, une population minoritaire de cellules tumorales, présentant des propriétés de cellules souches et appelées "cellules souches cancéreuses" (CSC), a été identifiée dans l'ostéosarcome. Ces cellules, qui sont responsables de la formation de tumeur, peuvent rester "dormantes" pendant de longues périodes et semblent résistantes aux traitements classiques utilisés en clinique (radio- et chimiothérapie). Ainsi, ces cellules pourraient être responsables du développement de la résistance et de la progression de nombreuses tumeurs.

Notre laboratoire s'intéresse au rôle d'un processus cellulaire appelé autophagie dans les cellules osseuses. Ce processus sert normalement à l'élimination du matériel cellulaire endommagé mais il peut également jouer un rôle dans certains processus de sécrétion et donc participer à la création du microenvironnement. Le but de ce projet est d'analyser la contribution de l'autophagie dans le dialogue entre l'ostéosarcome et le microenvironnement osseux.

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre les interactions entre la tumeur et son microenvironnement et, à terme, d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblant non plus la tumeur mais la niche tumorale.

En termes de remplacement, si de nombreuses expériences seront réalisées *in vitro* et *ex vivo*, ces données ne pourront être confirmées que dans un modèle *in vivo* de développement tumoral, telle que la souris. En effet, il n'existe pas de méthode alternative *in vitro* pouvant reproduire les interactions présentes entre les cellules responsables de la progression tumorale au sein du tissu osseux ; l'expérimentation animale permet de mener à bien ce projet.

En termes de réduction du nombre d'animaux utilisés, chaque souris sera son propre contrôle, la tumeur étant générée sur une patte et le contrôle étant la patte controlatérale. Par ailleurs, nous avons veillé à utiliser un nombre d'animaux le plus restreint possible sur la base des tests statistiques adaptés au modèle d'étude (Student t-test ou Mann-Whitney). Cette étude utilisera 192 souris sur 5 ans.

Le suivi quotidien des animaux permettra de détecter et consigner via la fiche de score tout signe de souffrance afin de prendre les mesures adéquates. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, et les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthique lors des manipulations et l'euthanasie des animaux. Cela nous permet de suivre attentivement les animaux et de détecter précocement tout signe de stress ou d'inconfort afin de prendre en charge au plus vite tout animal et de réduire tout risque de souffrance.

6245. Lorsqu'une artère est obstruée par un caillot sanguin, ou thrombus, les conséquences peuvent être dramatiques s'il n'est pas éliminé ou retiré rapidement. En effet, lorsqu'il se situe au niveau du cerveau, il peut être à l'origine d'un accident vasculaire cérébral (AVC). Près de 1.5 millions de nouveaux cas d'AVC sont recensés chaque année sur les principaux territoires occidentaux. Dans la prise en charge de l'AVC, chaque minute compte : le temps de re-perfusion (rétablissement du flux sanguin) est directement corrélé avec la probabilité de moindres séquelles pour le patient. Si le traitement des AVC a longtemps été limité à la seule voie chimique (dissolution du caillot induite par la prise de médicaments), il existe aujourd'hui une nouvelle technique très prometteuse qui consiste à retirer physiquement le caillot pour rétablir la circulation cérébrale: la thrombectomie mécanique. Le praticien dispose de deux méthodes afin de réaliser cette intervention : aspirer le caillot avec un cathéter d'aspiration, ou emprisonner le caillot dans un stent soudé au bout d'un cathéter (un stentriever) et tirer sur le cathéter pour retirer le caillot. Il a été montré que le succès de l'une ou l'autre méthode dépend fortement de la nature du caillot obstruant l'artère, c'est-à-dire de sa composition en globules rouges, en plaquettes, ou en fibrine. Or, à ce jour aucune technique ne permet de renseigner le praticien sur la nature du caillot.

Des capteurs micrométriques ont été développés afin de détecter de façon instantanée des caillots de composition différente. Ces capteurs viennent instrumenter des guides vasculaires couramment utilisés lors des interventions neurovasculaires. Les expériences *in vitro* sont prometteuses, mais l'environnement vasculaire réel qui sera au contact du capteur chez le patient, ne peut pas être reproduit au laboratoire ; en particulier, l'interaction entre la paroi des artères et le caillot, ainsi que l'altération du flux sanguin par le caillot, influencent de façon importante la mesure électrique réalisée par le capteur. Par conséquent, avant de tester les guides instrumentés chez l'Homme, il est donc indispensable de les vérifier chez l'animal et fournir aux praticiens une information pertinente et robuste.

Le modèle d'étude choisi est celui du porc, pour sa physiologie vasculaire très proche de celle de l'Homme, à la fois dans sa composition du sang et dans ses caractéristiques cardiovasculaires. Au total 15 animaux seront requis pour cette étude. Globalement, la procédure expérimentale consiste en l'implantation d'un thrombus autologue puis analyse *in vivo* du thrombus par le guide instrumenté. Le protocole prévoit d'abord l'analyse de thrombi de composition simple puis l'analyse de thrombi de composition plus élaborée, reproduisant la complexité des caillots retrouvés chez les patients atteints d'AVC.

Afin d'augmenter la statistique de mesure sans augmenter le nombre d'animaux, plusieurs thrombi seront implantés et analysés par animal. Les animaux seront sous anesthésie générale durant toute la durée de l'opération puis seront sacrifiés dans la journée, sans phase de réveil, évitant ainsi angoisse et douleur. Le protocole d'anesthésie fait appel aux techniques de suivis anesthésiques les plus performantes. Les procédures expérimentales seront réalisées par du personnel qualifié et expérimenté (chirurgiens seniors, cardiologues, techniciens anesthésistes) afin d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire le temps interventionnel ainsi que le nombre d'animaux nécessaires. Pour améliorer le bien-être de nos animaux avant et lors de nos interventions, nous prendrons soin de leur fournir un environnement adapté à chaque phase de l'expérimentation. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...).

6246. Lorsque l'on doit réséquer plus de 5-6 cm de trachée chez l'adulte ou la moitié de la trachée chez l'enfant pour des raisons carcinologique ou traumatiques (séquelles d'intubations prolongées, accident de la voie publique, etc) la suture directe des extrémités trachéales restantes est impossible. Les patients doivent porter une canule de trachéotomie permanente avec un impact social très important et des risques de complications majeures. De nombreux travaux visent à mettre au point un biomatériau capable de remplacer un segment de trachée. Un des obstacles à l'intégration de ces matériaux réside dans les réactions inflammatoires à leur contact, élément d'autant plus marqué qu'il s'agit de l'axe respiratoire (sécrétions bronchiques). Dans le cadre d'un projet européen, les auteurs ont mis au point des systèmes innovants à base d'hydrogel qui transportent des macrophages autologues et de phénotype contrôlé. L'ajout de ce gel contenant des immunomodulateurs a été testé avec succès sur des implants en titane (1ère phase d'expérimentation *in vitro* et sur la souris en sous-cutané), permettant ainsi d'améliorer l'intégration des implants et de réduire la morbidité. La dernière étape du projet européen vise à développer des implants de trachée avec immunomodulateur, soit imprimés en 3 dimensions (3D) soit obtenu par moulage, avec une phase d'expérimentation sur le rat, modèle déjà utilisé par d'autres équipes dans les remplacements de la trachée.

Ce projet consiste à remplacer des segments de trachée avec un biomatériau comprenant le gel immunomodulateur.

Ce projet de recherche médicale appliquée vise les objectifs suivants:

- Fabrication d'anneaux trachéaux imprimés en 3D et par moulage.

- Développement une nouvelle stratégie thérapeutique d'implantation personnalisée de segment de trachée afin de contrôler le type de réaction immunitaire adaptée à chaque patient et améliorer l'intégration des implants.

Ce projet est en adéquation avec les exigences de règle de 3R:

Remplacement : Dans cette étude, une analyse histologique comparative de la réponse au gel immunomodulateur pour la reconstruction de la trachée avec des groupes contrôles est nécessaire ; seule l'expérimentation sur l'animal permettra de réaliser cette étude.

Réduction : Les résultats des expérimentations réalisés dans la première partie du projet européen sont exploités afin de réduire le nombre d'animaux. L'étude *in vivo* sera réalisée sur 24 rats, nombre minimal pour obtenir de résultats statistiquement valides.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et de soins. Des enrichissements supplémentaires à la réglementation seront même utilisés. La procédure chirurgicale sera réalisée sous anesthésie générale et un traitement antalgique approprié est mis en place pour contrôler la douleur. Par ailleurs tous les animaux bénéficient d'une

attention et de soins particuliers pendant toute la durée de l'intervention mais également au dehors de celle-ci afin de s'assurer du bien-être de l'animal tout au long de l'expérimentation.

Les rats seront euthanasiés sous anesthésie générale avec réalisation d'une prise de sang pour analyse de l'inflammation.

6247. Certaines maladies génétiques rares sont causées par des mutations sur des gènes régulateurs de ce que l'on appelle les voies de signalisation intracellulaires. Ces voies de signalisation permettent aux cellules de percevoir les informations sur leur environnement (facteur de croissance, hormone, cellules voisines, nutriments, oxygène...) et de modifier leur comportement (prolifération, différenciation, migration, métabolisme...) afin de s'adapter aux conditions extérieures. Ces processus sont essentiels au cours du développement et dans le maintien de l'homéostasie (équilibre de l'organisme). En conséquence, leur dérégulation suite à une mutation génétique est à l'origine de nombreuses anomalies, notamment des malformations congénitales, des défauts de croissance ou des dysfonctions endocriniennes ou métaboliques, certaines pouvant avoir des conséquences dramatiques en l'absence de traitement efficace.

Si la plupart des mutations génétiques responsables de ces syndromes ont été identifiées, on ne sait souvent pas comment elles induisent les différents symptômes de ces maladies. Pourtant, comprendre les dysfonctionnements provoqués par ces mutations constitue une étape clé pour identifier des cibles thérapeutiques.

Les travaux des dernières années ont montré que des souris génétiquement modifiées, portant certaines mutations responsables de ces maladies génétiques (souris Knock In), développent l'ensemble des traits cliniques associés à ces syndromes. Ces souris représentent donc le modèle le plus proche qu'il existe des syndromes humains, offrant ainsi une opportunité unique pour mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies, ce qui ne peut être abordé que dans un modèle physiologique intégré (principe de remplacement).

Les objectifs de ce projet seront donc de caractériser 2 modèles murins d'un syndrome polymal formatif associant notamment des anomalies cardiaques et squelettiques et des dérégulations endocriniennes et métaboliques, de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents, et d'évaluer comment les dysfonctions identifiées participent au développement ou à l'aggravation des principaux symptômes post-nataux de ces maladies. Cela permettrait de proposer des candidats pour des thérapeutiques ciblées.

Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe homogène et de la durée des protocoles, des groupes de 8 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). La réalisation de l'ensemble du projet rendra nécessaire l'utilisation de 1848 animaux sur une durée de 5 ans.

Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être animal, sous anesthésie et analgésie lorsque nécessaire, pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux, et en respectant des points limites préalablement définis (principe de raffinement).

6248. Un des objectifs majeurs de l'expérimentation animale est de réduire l'utilisation des animaux, règle des 3R. Dans ce cadre, la technique de transfert d'embryons permet de réduire de façon conséquente la part d'animaux utilisés lors de la phase d'élevage des animaux utilisés en expérimentation. Cette technique permet non seulement l'acquisition d'un statut sanitaire de haut niveau, mais il permet également l'utilisation de la fécondation *in vitro* qui permet de produire des lots importants avec peu d'animaux, comme de revitaliser des embryons cryoconservés ou des embryons issus de fécondation *in vitro* à partir de sperme cryoconservé. Notre institut et son service des Sciences de la Reproduction met à disposition de nos élevages internes de rongeurs ou ceux de nos clients ces outils d'optimisation d'élevage. Tous ces outils ont été développés sur la technique du transfert d'embryons sur femelles pseudogestantes.

De plus, la cryoconservation est une technique qui a permis non seulement de réduire l'utilisation d'animaux vivants dans les échanges de modèles entre instituts ou centres de recherche mais aussi de sécuriser ceux-ci sur la maîtrise des conditions sanitaires lors des échanges. Lors de la revitalisation c'est cette technique de transfert d'embryons qui sera également utilisée.

Par ailleurs, nous utilisons également cette technique de transfert d'embryons couplée à une FIV (fécondation *in vitro*) afin d'augmenter le nombre d'embryons produits pour obtenir des lots d'animaux expérimentaux homogènes et aux effectifs permettant la réalisation d'étude spécifique. La FIV nous permet également de réduire considérablement le nombre de femelles utilisées par rapport à des accouplements classiques.

Pour la réalisation de ces transferts d'embryons, un maximum de 15 600 femelles pseudogestantes par an sera utilisé (80% souris et 20 % rats, soit environ 78 000 animaux pour ce projet sur 5 ans). D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet, répondant ainsi au besoin de raffinement décrit dans la règle des 3R. Les transferts d'embryons sont réalisés sous anesthésie générale suivie d'une surveillance renforcée des animaux. Cette procédure est appliquée sur l'ensemble de nos projets. Cette technique est aujourd'hui une des bases de la maîtrise du nombre d'animaux utilisés lors de la phase de production des lots destinés à l'expérimentation.

6249. L'objectif de ce projet consiste à tester une nouvelle approche de contrôle du développement de tumeur chez la souris. La lignée *CB57Bl/6* sera utilisée afin d'évaluer l'efficacité d'un composé X sur le développement d'une tumeur chez la souris.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 158 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation du composé X sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur ; tester cette molécule sur un modèle vivant avec une régulation complexe est indispensable à ce stade pour la validation de notre stratégie.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant l'obtention de résultats tangibles (puissance de test de 80% minimum) en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet. Pour cela, 158 souris de la lignée CB57Bl/6 seront utilisées.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Des points limite seront appliqués pour éviter toute souffrance importante des animaux.

6250. Les effets indésirables gastro-intestinaux (constipation ou diarrhée) représentent 67% des effets secondaires décrits pour les médicaments (anti-inflammatoires non stéroïdiens, antidépresseurs, anesthésiques...) et comptent pour 23% des événements défavorables rencontrés dans les études de phase I en clinique. De plus, la constipation est un problème de santé courant touchant environ 30% de la population française et qui affecte sensiblement la qualité de vie.

Le transit intestinal est un phénomène physiologique complexe qui ne peut pas être mimé par des modèles cellulaires ; c'est le cas également des problèmes d'accessibilité du candidat médicament à sa cible. Le recours aux modèles animaux est donc indispensable pour étudier l'effet de candidats médicaments sur le transit intestinal.

Les objectifs de ce projet sont d'évaluer :

- l'effet thérapeutique de candidats médicaments sur le transit intestinal

- les effets secondaires de molécules à tester

Pour répondre à ces objectifs, cinq procédures pourront être réalisées.

Dans le cas où l'objectif est d'évaluer les effets thérapeutiques d'un candidat médicament, il sera nécessaire d'induire au préalable, une modification du transit afin de mimer la constipation ou la diarrhée.

Trois méthodes d'évaluation pourront alors être utilisées:

- mesure de la vitesse de transit,

- évaluation de la consistance des crottes et de leur pourcentage d'humidité,

- évaluation de la quantité de fluide dans la lumière intestinale.

Pour étudier les effets secondaires, la molécule à tester sera administrée aux animaux et les trois évaluations citées précédemment pourront être réalisées.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 4800 rats et 4800 souris à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou de doses à tester. Les tests statistiques réalisés seront fonction de la normalité et de la distribution des données (tests paramétriques ou non paramétriques...).

Conformément à la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux cages des animaux. A savoir, pour les souris, des carrés de coton pur (type nestlets) ou des igloos permettant aux animaux de faire une nidation. Pour les rats, l'enrichissement sera des Aspen brick moyen (enrichissement en bois de tremble) ou des tunnels en polycarbonate. Les rats seront hébergés dans des cages à couvercle filtrant ou ventilées à raison de 3 à 4 animaux/cage pour un poids n'excédant pas 300 g et à raison de 2 animaux/cage dans le cas contraire.

Les souris seront hébergées dans des cages à couvercle filtrant ou ventilées à raison de 2 à 8 animaux/cage pour un poids n'excédant pas 30 g et à raison de 2 à 5 animaux/cage dans le cas contraire.

6251. Dans le cadre de ses activités de recherches pharmaceutiques, notre entreprise propose ses services à des sociétés tierces. Nous réalisons des études de la pharmacocinétique de composés d'intérêt pharmacologique dont nous ne pouvons révéler l'identité ici (protection du secret industriel).

Nous faisons l'évaluation de ces composés sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. L'évaluation *in vitro* permet dans une première approche de réduire le nombre de composés à tester chez l'animal mais l'évaluation sur l'animal reste indispensable sur les composés les plus prometteurs (application du principe de remplacement). En effet, la complexité et l'interdépendance des mécanismes d'Absorption/ Distribution/ Métabolisme/ Elimination (ADME) ne peut s'appréhender que sur des animaux.

Nous prévoyons un nombre de souris d'environ 1 200, ainsi qu'environ 350 rats pour la période 2017-2021, il s'agit du minimum d'animaux nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux. Des points limite seront appliqués pour éviter toute souffrance importante des animaux.

6252. Notre entreprise travaille sur le développement de molécules thérapeutiques permettant de traiter les différents types de fibrose, qui sont un problème de santé majeur.

La fibrose désigne la transformation de certains tissus en un tissu cicatriciel, proche du tissu conjonctif. Elle intervient souvent à la suite d'une lésion tissulaire ou d'une inflammation d'un tissu qui ne se régénère pas correctement : le tissu initialement sain est alors remplacé par un tissu fibreux. Lors d'une lésion tissulaire, l'évolution normale se fait vers la cicatrisation. En cas de déséquilibre du système entrant dans ce phénomène de réparation, il y a une production excessive et continue de collagène ce qui conduit vers la fibrose. La fibrose peut toucher de nombreux organes tels que le pancréas, le rein, la peau, le foie ou le poumon.

A ce jour, aucun médicament utilisé dans le traitement de la fibrose n'a permis de réverser une fibrose établie que ce soit sur le plan histologique ou clinique.

Les composés testés chez l'animal seront sélectionnés dans un premier temps à l'aide de test sur les cellules afin d'optimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés dans les études en respect de la règle des 3R. Seules les molécules présentant une activité sur les tests *in vitro* et ayant des caractéristiques pharmacocinétiques adéquates seront testées sur les animaux. Ce système permet de réduire considérablement le nombre de molécules testées chez l'animal et donc le nombre d'animaux utilisés. Nous estimons à environ 10 000 animaux (8 650 souris et 1 350 rats) sur 5 ans, le nombre d'animaux utilisés dans les études dédiées au projet fibrose. Nous appliquerons si nécessaire des points limite pour éviter toute souffrance importante des animaux.

6253. En chirurgie humaine (orthopédique ou dentaire), lorsqu'une intervention nécessite le comblement d'un déficit osseux, l'utilisation d'un biomatériau permet de simplifier les procédures en évitant aux patients une étape de prélèvement d'os au niveau d'un second site, sain. En effet, certaines approches thérapeutiques (ablations de tumeurs, de kystes, de foyers infectieux...) peuvent aboutir à des pertes de substances osseuses importantes que les processus naturels de réparation tissulaire sont incapables de reformer. La reconstruction de l'os doit alors être assistée. La technique de référence consiste à prélever ailleurs dans le corps du patient un fragment de tissu osseux qui sera utilisé afin d'aider la réparation de l'os lésé. On parle alors d'autogreffe. L'autogreffe n'induit pas de réaction immunitaire puisque le tissu est celui du patient ; elle présente néanmoins trois limites majeures : elle suppose deux interventions (prélèvement puis greffe), la quantité de greffon est limitée et la survie des cellules transplantées est faible. Une autre solution consiste à utiliser des biomatériaux. La recherche autour des matériaux à finalité médicale a permis l'émergence de produits de plus en plus efficaces qui permettent d'étendre les indications chirurgicales et d'améliorer les résultats obtenus. L'utilisation de biomatériaux pour favoriser le retour à la fonction tissulaire nécessite une connaissance approfondie du comportement de ces derniers dans l'organisme receveur. Aussi leur implantation *in vivo* est un prérequis indispensable à leur utilisation clinique. Cette implantation permet de prendre en considération l'intégralité des réactions de l'hôte vis-à-vis de biomatériaux, les études *in vitro* préalables ne permettant que de suggérer leur potentiel thérapeutique et/ou leur innocuité. La complexité des systèmes physiologiques mis en place et leur intégration ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives. Afin d'évaluer au mieux les paramètres physiologiques entrant en jeu lors de l'implantation de biomatériaux, nous proposons une technique utilisée en chirurgie humaine (technique de Masquelet), qui a été transposée chez le rat. Les objectifs de ce projet sont à la fois d'étudier la réparation de l'os à l'aide de biomatériaux et d'améliorer la technique chirurgicale par l'utilisation d'outils innovants. Afin d'obtenir des résultats exploitables scientifiquement le nombre minimum nécessaire d'animaux est de 114 rats. L'ensemble des expérimentations seront réalisées dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Le projet s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en optimisant les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux et en tenant compte de la sensibilité des animaux ainsi que les contraintes liées à l'espèce. Ce projet tient compte des points limites et de la prévention de la douleur afin d'éviter la souffrance et de favoriser le bien-être des animaux tout au long des expériences. Ces études permettraient une amélioration de la prise en charge chirurgicale des patients, des pistes de développement de nouveaux biomatériaux ainsi qu'une augmentation des connaissances de leur utilisation.

6254. Pour évaluer la sécurité des produits chimiques sur la santé humaine, différentes études sont nécessaires. Ces études combinent des modélisations mathématiques par ordinateur (études *in silico*), des modèles cellulaires (tests *in vitro*) et des modèles animaux (études *in vivo*). L'objectif est de ne soumettre à autorisation que des produits dont le profil toxicologique garantit l'absence d'effet néfaste sur la santé humaine.

Ce projet a pour but d'évaluer la toxicité aiguë ou subaiguë des molécules ; ce sont les premières études toxicologiques réalisées chez l'animal et par conséquent interviennent tôt dans le processus de développement des produits. La toxicité aiguë désigne des effets nocifs résultant de l'administration d'une seule dose d'un produit ou d'une seule exposition à celui-ci. Les données générées permettent de déterminer son potentiel toxique et ainsi de classer la substance entre des produits non toxiques ou au contraire toxiques en cas d'exposition aiguë (risque accidentel). Les molécules qui démontrent une toxicité aiguë élevée sont éliminées dès ce stade de développement.

Toutes ces études se font dans le respect des 3R.

A ce stade du développement d'un produit chimique, les informations sur la caractérisation du profil toxicologique de celui-ci sont parcellaires, et souvent inexistantes dans un organisme entier, par conséquent les études *in vivo* sont incontournables pour appréhender les effets d'un produit chimique sur un être vivant. Ces études permettent également de sélectionner les procédures les plus pertinentes pour limiter le nombre d'animaux et pour raffiner la conception des études. Pour que les études de criblage ou de screening soient les plus prédictives possibles, elles sont réalisées sur les mêmes espèces que les études constitutives du dossier de l'AMM (rongeurs : rats et souris).

Chaque étude dure de 1 jour à 8 jours maximum, avec un nombre restreint d'animaux par groupe (3 à 5 animaux) et en général un seul sexe. Par an, un total de 700 rats et de 500 souris seront utilisés pour l'évaluation d'environ 300 molécules différentes, soit 6000 rongeurs sur 5 ans.

Dans le cas des études *in vivo*, la priorité est de garantir le bien-être des animaux par conséquent on n'administre les produits qu'à des doses appropriées. Les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu adapté à leur bien-être, à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (weekends et jours fériés compris). Toutes les informations concernant les animaux sont enregistrées dans un logiciel. Des points limites ont été définis par le laboratoire ; ils conditionnent l'appel à un vétérinaire du site pour un traitement ou l'arrêt de la procédure. Une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée au moins 2 fois par an, par le Comité d'Éthique.

6255. Au cours de la recherche d'un candidat médicament, outre les études effectuées *in vitro* (identification des cibles moléculaires, effets sur les cultures cellulaires ou sur des organes isolés...), un ensemble d'études *in vivo*, utilisant des animaux, est nécessaire pour s'assurer de la sécurité d'emploi (dose maximale tolérée...) et de leur efficacité (dose active sur un organe ou un tissu). Pour constituer le dossier examiné par les autorités de santé, la réglementation internationale et française impose ces études obligatoirement sur au moins deux espèces animales, dont une « non rongeur », et avant toute étude clinique chez l'homme. L'objectif de ce projet est la réalisation des études de toxicologie et de pharmacologie, en vue d'une administration unique ou répétée d'un candidat médicament, chez le lapin. Le lapin est une des espèces « non rongeur » très utilisée pour les études de toxicologie, puisqu'elle présente une grande sensibilité aux malformations; par ailleurs il est également l'espèce recommandée pour l'évaluation de la toxicité des vaccins. Les animaux seront soumis à des études qui respectent les recommandations internationales en vigueur (durée, paramètres étudiés) : une ou plusieurs doses de la molécule seront administrées, des prélèvements sanguins ou des examens physiologiques pourront être effectués à des intervalles de temps réguliers. La majorité des animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude pour procéder à des analyses histologiques post mortem. Le reste des animaux pourraient être inclus dans une autre étude après vérification par un vétérinaire de leur bon état de santé. Du fait qu'un grand nombre d'études et un grand nombre de produits, plusieurs voies d'administration et plusieurs doses à tester, le nombre total d'animaux utilisés pendant les 5 ans est estimé à 12240. Pour chaque étude néanmoins l'exigence de réduction sera respectée des analyses statistiques seront conduites pour s'assurer de la fiabilité des observations tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux par groupe... Un autre élément permettant de réduire le nombre d'animaux est l'effort porté sur leur homogénéité : pour cela la démarche commence dès l'approvisionnement auprès des éleveurs et des fournisseurs agréés, mais surtout par la maîtrise tout au long de leur vie de bonnes conditions d'environnement et d'entretien (alimentation adaptée, contrôle de la température des locaux, surveillance quotidienne...). Les lapins bénéficient d'un programme d'enrichissement, avec notamment à leur disposition, un rondin végétal, un bâtonnet en bois. En ce qui concerne le raffinement des procédures, nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux et nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité. La douleur sera prévenue 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. L'étroite collaboration des Directeurs d'études et de la Structure du Bien-Etre Animal aura pour objectif de réduire les dommages en respectant la règle des 3R.

6256. La mémoire de travail est la capacité de retenir des informations à court terme, quelques secondes ou quelques minutes, pour réaliser des opérations cognitives fondées sur ces informations. Bien que les mécanismes neuronaux restent à clarifier on suppose que ce processus repose sur la persistance de l'activité neuronale, codant l'information à retenir, pendant la période de rétention mnésique.

La mémoire de travail olfactive, i.e. la rétention transitoire des caractéristiques d'une odeur, peut être induite et étudiée dans des modèles animaux et pour cela elle constitue une porte d'entrée à l'étude des mécanismes cellulaires sous-jacents.

L'objectif de ce projet est d'élaborer un protocole expérimental permettant d'étudier la mémoire de travail chez la souris. Les résultats obtenus permettront de déterminer les paramètres expérimentaux les plus aptes à cette fin et d'optimiser, en termes de durée de la procédure expérimentale, de bien-être animal, de nombre d'animaux utilisés et la planification d'études ultérieures chez la souris.

Ce protocole est basé sur l'association odeur-récompense (une croquette de céréale) et comporte, comme seule contrainte pour les animaux, une restriction alimentaire afin d'augmenter leur motivation à apprendre la tâche. Sur la base des données de la littérature scientifique nous utiliserons des conditions de restriction alimentaire dont il a été démontré l'absence d'impact sur la santé animale et nous nous assurerons de cette absence d'effets nocifs en surveillant quotidiennement les animaux (poids) et leur bien-être.

Conformité avec la règle de 3R :

Remplacement. Le modèle animal n'est pas strictement nécessaire pour mettre en évidence et évaluer la mémoire de travail, mais il est incontournable pour étudier les mécanismes cellulaires sous-jacents. Les résultats de notre étude seront utilisés à la planification de projets scientifiques ultérieurs visant à étudier ces mécanismes chez la souris.

Réduction. Notre projet est une étude préliminaire (étude pilote) sur un nombre réduit d'animaux, destinée à déterminer l'effectif minimum requis pour nos futures études. Une autorisation pour un nombre total de 20 animaux est demandée afin de prendre en compte d'éventuelles pertes due aux critères d'arrêt de la procédure expérimentale et la variabilité interindividuelle et aléas inhérents aux tests comportementaux. Une évaluation statistique nous a permis de prédire que nos objectifs seraient atteints lorsque 10 animaux auront complété la procédure expérimentale d'apprentissage. L'expérience sera par conséquent arrêtée dès l'observation de l'effet attendu de façon à n'utiliser que l'effectif d'animaux nécessaire à la validation statistique. Les animaux surnuméraires seraient alors replacés dans d'autres procédures menées au laboratoire.

Raffinement. Les souris seront hébergées en groupes de 5 animaux dans des cages présentant des éléments d'enrichissement (cachettes, tuyaux, roue d'activité, bois à grignoter...) dans notre animalerie agréée avec boisson *ad libitum*. Un éventuel impact de la procédure expérimentale sur le bien-être animal sera évalué quotidiennement en se basant sur des signes précoces comme le poids, l'état du pelage et la mobilité. Des critères d'arrêt de la procédure expérimentale sont mise en place afin de suspendre l'expérience si un animal présente des signes d'inconfort.

Une fois l'étude terminée tous les animaux pourront être réutilisés dans d'autres procédures expérimentales après accord de la structure bien-être animal et de notre vétérinaire référent.

6257. Le but de ce projet est d'assurer, conformément aux exigences de la réglementation sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la formation du personnel aux techniques pratiquées par le laboratoire de recherche, et d'assurer la formation continue qui permet de maintenir à niveau les compétences de chacun.

La formation est réalisée sous la responsabilité du responsable de formation qui s'assure du respect des recommandations internationales publiées et du respect du bien-être et du confort des animaux.

Les espèces concernées sont des non rongeurs (chiens, porcs, primates non humains, furets) : l'espèce utilisée et le type d'actes réalisés reflètent ceux qui sont effectués au cours de nos études. Le projet comporte 6 procédures : les 4 premières procédures correspondent aux administrations de substances et aux prélèvements pour chacune des espèces (1 procédure par espèce), la 5ème procédure correspond à une formation à la chirurgie sous anesthésie sans réveil, et la 6ème procédure correspond à une formation à la chirurgie en prévoyant le réveil des animaux. Sont incluses dans les 4 premières procédures les formations à l'anesthésie et à la mise à mort. Chaque technique est apprise séparément et un superviseur s'assure que chaque personne valide son apprentissage jusqu'à l'autonomie.

La démarche de remplacement est prévue en utilisant des documents et dans la mesure du possible des supports vidéos. Néanmoins, l'utilisation des animaux vivants reste nécessaire dans le but d'approfondir la compétence technique des personnes et de les former aux espèces et aux actes particuliers prévus dans les études en intégrant la prise en compte des réactions et comportement des animaux.

Pour assurer la formation d'environ 50 personnes pour les miniporcs/chiens/primates non humains et d'environ 10 personnes pour les furets, ce projet utilisera au maximum 40 mini porcs, 40 chiens, 40 primates et 10 furets par an (soit au maximum sur 5 ans : 200 miniporcs, 200 chiens, 200 primates et 50 furets). Le nombre pour chaque espèce est ajusté au minimum nécessaire et tient compte des besoins d'acquérir une compétence technique validée pour l'ensemble des techniques nécessaires et à plusieurs âges des animaux. La démarche de réduction est prévue en optimisant le nombre d'animaux, tout en limitant cependant le nombre d'actes sur un même individu.

Dans la mesure du possible et sauf exception pour un projet spécifique, les animaux utilisés seront issus d'un précédent projet et non commandés pour cette formation.

Concernant le Primate non humain, conformément aux exigences réglementaires, la formation ne visera que l'acquisition de compétences nécessaires à la réalisation de nos études et pour lesquelles, des éléments scientifiques démontrent que celui-ci ne peut être remplacé par aucune autre espèce animale non rongeur. Les animaux utilisés seront ceux déjà présents au sein de laboratoire.

Dans un souci de raffinement, toutes les techniques seront enseignées selon des méthodes recommandées par la Structure du Bien-Etre Animal pour minimiser l'impact sur l'animal et avec une surveillance accrue des points limites. Les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum, et une anesthésie (normalement pas nécessaire pour des gestes peu invasifs) pourra être envisagée en début d'apprentissage.

L'hébergement est conforme aux recommandations en vigueur. Les animaux disposent d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de leur environnement. Notre standard est de socialiser les animaux (sauf exceptions : miniporcs mâles, animaux en post-chirurgie en fonction de l'intervention pratiquée et si nous disposons d'un seul animal par sexe). Les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum. En post-chirurgie, les animaux seront ou non socialisés selon le type d'intervention réalisée. De plus, pour éviter les bagarres, les mini porcs mâles sont maintenus isolés. Dans le cas d'isolement, les animaux restent en contact visuel, auditif et olfactif avec des congénères et ont accès à un enrichissement de l'environnement.

[Autorisation modifiée]

6258. Les autorités de santé vétérinaire demandent la démonstration de l'innocuité, de la toxicité et de l'inactivation de chaque vaccin ou formule vaccinale via des contrôles qualité qui ont pour finalité l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Objectifs : Ce projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires, selon les éléments du dossier d'AMM correspondant aux vaccins à contrôler. Les tests ont pour but de confirmer l'innocuité, l'absence de toxicité, l'inactivation d'une formulation vaccinale, ainsi que l'innocuité d'adjuvants entrant dans la composition de vaccins destinés aux animaux de rente.

Une équivalence entre les modèles animaux (espèce cible et espèce alternative) a été définie par les Pharmacopées. Ceci permet d'utiliser les modèles rongeurs et d'éviter le recours aux espèces cibles afin de garantir une commercialisation de vaccins efficace et sûrs.

Ces tests garantissent la sûreté, l'efficacité et la qualité du produit pour les animaux. Ils permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour la mise sur le marché de lot commercial. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays.

Réduire : le nombre, le statut et le sexe des animaux utilisés sont imposés par la réglementation des pays ou par la Pharmacopée. Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage nous utiliserons des lots entre 2 et 10 animaux maximum, soit 1000 cobayes et 4000 souris sur 5 ans ; le nombre utilisé varie d'année en année en fonction du nombre de lots de vaccins ou formules vaccinales à tester et des réglementations des différents pays destinataires.

Raffinement : dans ce projet, seule une douleur minime peut survenir et aucun point limite spécifique n'a été défini. Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections des vaccins et aux manipulations. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal ne serait plus dans sa zone de confort.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour optimiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements.

La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

6259. Dans le but de faciliter l'administration par voie orale chez le chat d'un médicament ou d'un nutraceutique en cours de développement, la prise volontaire, et donc l'appétence du produit, est primordiale. Un produit qui doit être mélangé à la nourriture n'est pas considéré appétant.

L'appétence des produits peut être améliorée par l'ajout de composés odorants, bien que ce ne soit pas toujours nécessaire, ce qui se traduit par une meilleure prise spontanée par les animaux et facilite ainsi la bonne observance du traitement par le propriétaire. Pour pouvoir revendiquer l'acceptance/appétence (ou palatabilité) du produit, des études appropriées sont requises puisque la référence à la seule composition n'est pas suffisante pour garantir l'appétence. En effet, la forme, la texture, la taille, la dureté ou encore l'odeur du produit peut influencer sur la bonne acceptabilité du produit par l'animal et donc sa consommation spontanée.

La prise spontanée peut être évaluée sur une prise unique ou sur des prises répétées, l'étude sera alors dénommée acceptance ou appétence respectivement.

L'objectif du projet (dénommé par la suite protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études d'acceptance/appétence chez le chat dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R, pour pouvoir évaluer la consommation spontanée par l'animal du produit en développement. Plusieurs études d'acceptance/appétence pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit, selon le schéma posologique envisagé, avec une présentation unique ou des présentations répétées du produit au même animal.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables pour revendiquer l'acceptance/appétence du produit. Ces études d'acceptance/appétence doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le chat, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études d'appétence. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon le schéma posologique (administration unique ou sur le long terme) du produit testé, et selon les exigences des textes réglementaires et les recommandations des lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux n'excèdera pas 300 animaux sur la durée du projet.

L'acceptance/appétence étant évaluée par la prise spontanée du produit à tester par l'animal, aucun traitement n'est imposé à ce dernier.

- Toutes les présentations de produits seront réalisées conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun produit 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 tout changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit ou de poids dans les jours suivant la consommation du produit ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal.

- Les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

6260. Les autorités de santé vétérinaires demandent la démonstration de l'activité et du titre des lots commerciaux de chaque vaccin ou formule vaccinale via des contrôles qualité qui a pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). De ce fait, la sécurité des vaccins doit être évaluée sur des modèles animaux. De plus, la Pharmacopée Européenne demande la démonstration de résultats, certains devant être obtenus sur l'animal.

Ce projet a pour objectif de contrôler la conformité des vaccins avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires selon les éléments du dossier de l'AMM. Les tests ont pour but de déterminer l'activité des vaccins destinés aux animaux de rente. Ils garantissent la sûreté, l'efficacité et la qualité du produit pour les animaux. Ils permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Les contrôles d'activité d'épreuve et de titrage se basent sur le développement ou non de la pathologie après injection de l'agent infectieux ou de la toxine (les animaux vaccinés sont protégés).

Une équivalence entre les modèles animaux (espèce cible et espèce alternative) a été démontrée ; ceci permet d'utiliser les modèles rongeurs et d'éviter le recours aux espèces cibles afin de garantir une commercialisation de vaccins efficaces et sûrs.



Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour la mise sur le marché de lots commerciaux. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays.

Réduire : le nombre, le statut et le sexe des animaux utilisés sont imposés par la réglementation des pays ou par la Pharmacopée. La réduction du nombre est possible grâce à la mutualisation de groupes de références et de témoins. Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage nous utiliserons, au maximum, 7000 cobayes et 20000 souris sur 5 ans. Le nombre utilisé varie d'année en année en fonction du nombre de lots de vaccins ou formules vaccinales à tester, des calibrages de réactifs et des réglementations des différents pays destinataires.

Raffinement : Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections et aux manipulations. Les cobayes témoins non vaccinés, en nombre réduit, montrent les symptômes liés à la pathologie testée qui peuvent induire une douleur. Les souris peuvent montrer des symptômes sévères liés aux toxines testées. Des points limites spécifiques aux pathologies sont définis pour les cobayes témoins non vaccinés ou les titrages sur souris. Le personnel compétent vérifie l'évolution de l'état général et applique les points limites définis le cas échéant.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

6261. Dans le cadre de la recherche et du développement des médicaments vétérinaires, la loi impose que l'innocuité des candidats médicaments soit évaluée lors d'études précliniques chez une espèce de rongeur et dans l'espèce cible. L'espèce rongeur est également utilisée pour valider l'effet pharmacologique des candidats médicaments.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de toxicité et d'activité pharmacologique chez le rongeur dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R.

Plusieurs études de toxicité et/ou d'activité pharmacologique pourront être requises pour établir le profil toxicologique/tolérance, définir la dose ou encore acquérir des données de pharmacodynamie pour le produit en développement. Il s'agit de l'étude:

- de la toxicité aiguë, qui permet une étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qui se manifestent pendant une période donnée résultant d'une administration unique d'un produit,

- et de la toxicité répétée, qui permet de mettre en évidence des altérations fonctionnelles et/ou anatomo-pathologique consécutives à une administration répétée du produit et également de déterminer la limite d'innocuité expérimentale NOAEL.

Ces informations sont indispensables avant de passer dans l'espèce de destination du médicament. L'espèce cible du présent projet est le rongeur, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de toxicité, en administration unique ou répétée, des études de pharmacologie. Le projet est conçu pour être répété en totalité ou partiellement. Il vise à caractériser les effets toxiques et/ou pharmacologiques de nouveaux produits chez le rongeur cela sera fait sans compromettre l'atteinte de l'objectif mais dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement.

Les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être. Le nombre d'animaux inclus 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 (exemples : toxicité aiguë, répétée), le nombre de voie d'administration à tester, 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 2000 rats et 2000 souris.

- tous les traitements, prélèvements et euthanasies seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'Union Européenne (UE),

- les animaux seront suivis quotidiennement depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude. Des indicateurs précoces de toute souffrance sont définis dans une grille d'évaluation, élaborée (et régulièrement revue) conjointement par la Structure chargée du Bien- Etre Animal, le Comité d'Ethique et les expérimentateurs.

Toute observation laissant présager un début de mal-être ou atteinte des points limites (changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit, perte de poids, altération de la respiration, excrétion anormale dans les jours suivant le(s) traitement(s)), est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger celui-ci. Les conditions d'hébergement permettent de répondre aux besoins physiologiques des animaux.

Ce projet couvre également :

- des études d'interaction de médicaments ou à visée mécanistique (biomarqueurs) permettant de comprendre et prédire les effets toxiques de produits en développement,

- le recueil de tissus ou de matrices dans le but de préparer des matrices biologiques témoins requises pour les activités de bioanalyse

- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes et/ou la génération de données historiques.

6262. Dans le cadre de la recherche et du développement de médicaments vétérinaires, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-distribution-métabolisme et élimination, ADME). En phase de développement, les quantités des molécules à tester sont minimales et seules les études sur les rongeurs permettent d'apporter ces informations avec peu de produit.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le rongeur afin d'établir le profil pharmacocinétique et la biodisponibilité du produit en développement dans divers tissus, organes

et/ou fluides de l'organisme. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises selon l'état d'avancement et du développement du produit.

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

Ces informations sont indispensables avant de passer dans l'espèce dont le médicament est destiné.

L'espèce cible du présent projet est le rongeur, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le projet vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le rongeur tout en respectant le bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement.

Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit à tester, le stade d'avancement du développement de celui-ci, la finalité de l'étude (évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit) et dans le respect des textes réglementaires (lignes directrices correspondantes en vigueur). Le nombre total d'animaux sur la durée du projet n'excèdera pas 2000 animaux.

Tous les traitements, les prélèvements et éventuellement les euthanasies, seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'Union Européenne (UE) Les animaux seront suivis quotidiennement depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude. Toute observation laissant présager l'atteinte des points limites (changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit, perte de poids, dans les jours suivant la pharmacocinétique) est immédiatement signalée au vétérinaire qui prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal ; les animaux alors seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance. Les conditions d'hébergement seront adaptées aux besoins physiologiques des animaux.

6263. Dans le cadre de la recherche et du développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés aux chats, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-distribution-métabolisme et élimination, ADME).

L'objectif de ce projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le chat afin d'établir le profil pharmacocinétique du produit en développement et évaluer sa biodisponibilité, le tout dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises selon l'état d'avancement du développement de la molécule.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le chat, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclus 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 (évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit et bioéquivalence) et dans le respect des textes réglementaires (lignes directrices correspondantes en vigueur). Le nombre total d'animaux sur la durée du projet n'excèdera pas 300 animaux.

Tous les traitements et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'Union Européenne (UE). Les animaux seront suivis quotidiennement depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude. Toute observation laissant présager l'atteinte des points limites (changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit, perte de poids, dans les jours suivant la pharmacocinétique) est immédiatement signalée au vétérinaire qui prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal ; les animaux seront alors soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance. Les conditions d'hébergement seront adaptées aux besoins physiologiques des animaux.

Les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

Ce projet permet également le recueil du 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.

6264. Le cancer du sein (tumeur primaire) est une tumeur maligne qui peut se propager dans tout l'organisme : on dit alors qu'elle métastase. A ce stade, les patients ont dans le sang périphérique des cellules tumorales circulantes (CTCs) qui peuvent disséminer dans la moelle osseuse. Celles-ci sont alors appelées DTCs. La présence de DTCs n'est pas seulement prédictive de la survenue de métastases osseuses, mais également de métastases dans d'autres tissus tels que le foie, les poumons ou le cerveau. Il y a actuellement une hypothèse proposant que les cellules tumorales disséminées dans la moelle osseuse prennent la place des cellules souches hématopoïétiques dans la niche ostéogénique (un environnement riche en ostéoblastes et en cellules souches mésenchymateuses présents dans la moelle osseuse) en utilisant les mêmes mécanismes. Ces DTCs vont ensuite pouvoir proliférer et être responsables d'une destruction massive de l'os (ostéolyse) du fait d'une activation des ostéoclastes. Ces métastases ostéolytiques génèrent de grandes douleurs et des fractures pathologiques et peuvent même engager le pronostic vital des patientes. A l'heure actuelle, les métastases osseuses sont incurables et les traitements sont donnés uniquement pour améliorer la qualité de vie des patientes. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des métastases dérivant d'un cancer du sein afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

ROBO4 est une protéine impliquée dans la régulation de la migration vasculaire mais c'est aussi un facteur important de l'ancrage des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. Des travaux réalisés au laboratoire ont montré qu'une des formes de ROBO4 est produite en abondance dans les cellules cancéreuses dites ostéophiles (littéralement aimant l'os). De plus, sa détection chez la patiente présentant un cancer du sein est associée à une diminution de leur survie et une augmentation du risque

de rechute métastatique au niveau de l'os. Nous avons donc émis l'hypothèse que la présence de ROBO4 au sein des cellules tumorales d'origine mammaire pourrait contribuer à la migration et à l'ancrage des DTCs dans l'os favorisant ainsi la formation de métastases. Le projet a pour objectif de caractériser le rôle de cette protéine dans les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules de la niche ostéogénique. Les résultats de cette étude permettront de nous éclairer sur les mécanismes mis en place lors de la formation des métastases dans la moelle osseuse. Il apportera aussi une ouverture sur le développement clinique de thérapie ciblant ce récepteur afin de prévenir et d'inhiber la dissémination et la croissance des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse. Des résultats encourageant nous ont déjà permis d'observer une interaction préférentielle entre les cellules cancéreuses et les cellules souches mésenchymateuses (CSM). De plus, nous évaluons actuellement l'effet d'une invalidation génétique du récepteur ROBO4 dans un modèle cellulaire qui forme spécifiquement des métastases osseuses. Pour finir, la greffe sous-cutanée des CSMs associées à du calcium et du phosphate nous permet de reconstituer une niche ostéogénique humaine chez la souris immunodéficientes. Ainsi, ce modèle nous permettra d'évaluer l'efficacité d'un anticorps ciblant ROBO4, couplé ou non à une chimiothérapie conventionnelle, à inhiber la colonisation de la niche ostéogénique sous-cutanée par les cellules tumorales. Les résultats obtenus nous permettront d'identifier un des mécanismes impliqués dans la formation des métastases osseuses et nous apporteront une preuve de concept pour le développement clinique de thérapie ciblant les récepteurs identifiés. Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R seront les suivantes :

**Remplacement :** L'influence que peut avoir le récepteur RoBo4 sur des phénomènes tels que la migration, la colonisation et l'ancrage osseux lors de la formation des métastases ne peut pas être exclusivement appréciée par des tests *in vitro*. L'utilisation d'une lignée cellulaire d'origine humaine chez la souris tentera de reproduire un cas pathologique clinique (métastases osseuses du cancer du sein). Les cellules étant d'origine humaine, pour ces expériences nous utiliserons des souris femelles consanguines immuno-déficientes.

**Réduction :** Afin de réduire le nombre de souris utilisé, chaque groupe contiendra le nombre minimum d'animaux (10 souris par groupe) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 120 souris sera nécessaire.

La première étape sera une étape dite « Go/No Go », à l'issue de laquelle, si les résultats ne sont pas ceux attendus, nous arrêterons les expériences et le projet s'arrêtera. Seulement 40 souris seront alors utilisées.

En outre, l'utilisation de l'imagerie non invasive pour suivre l'évolution des tumeurs et les atteintes osseuses chez les animaux vivants, permet de réduire le nombre d'animaux requis.

**Raffinement :** Les souris cohabiteront par groupe de 5 dans un environnement enrichi (maison rouge, coton) renouvelé une fois par semaine. Afin de permettre l'acclimatation des animaux à leur nouvel environnement, les souris à leur arrivée seront placées en stabulation durant une semaine au sein de l'animalerie d'accueil et sous surveillance journalière. Les protocoles seront réalisés chez des souris anesthésiées au moment des injections. Afin de limiter la douleur des animaux, les souris seront traitées avec un analgésique systémique et un anesthésique local lors de tous gestes chirurgicaux. L'état de bien être des souris sera évalué quotidiennement en mesurant les troubles cliniques potentiels (atteinte de l'état général, boiterie, anomalie comportementale, réaction à la manipulation...), à l'aide d'une fiche de suivi clinique par score ; si besoin, elles seront traitées par des médicaments analgésiques ou bien sorties de l'étude et euthanasiées si un des points limite définis dans ce projet est atteint.

6265. Les maladies cardio-vasculaires représentent l'une des premières causes de mortalité dans tous les pays industrialisés. Parmi elles, l'insuffisance cardiaque (selon le NHI la prévalence est de 23 millions de personnes atteintes dans le monde) est une pathologie qui présente un ensemble de symptômes qui font que le cœur n'assure pas le débit sanguin nécessaire aux besoins de l'organisme. L'insuffisance cardiaque se développe généralement lentement après une lésion cardiaque dont l'origine peut être causée par une crise cardiaque, une fatigue excessive du cœur après des années d'hypertension non traitée ou une valvulopathie. Les causes les plus courantes d'insuffisance cardiaque sont :

- L'insuffisance coronarienne.
- La crise cardiaque antérieure (infarctus du myocarde).
- L'hypertension.
- Une valvulopathie (dysfonctionnement des valves cardiaques).
- Une maladie cardiaque congénitale (maladie de naissance).
- Une cardiomyopathie (hypertrophie ou dilatation du cœur).
- Une endocardite (inflammation des structures et de l'enveloppe interne du cœur).
- Une myocardite (infection du cœur).
- Le diabète.

Dans ce projet, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'insuffisance cardiaque causée par une cardiomyopathie d'origine métabolique (diabète, obésité et dystrophie du foie gras non alcoolique ou NAFLD), celle-ci est caractérisée par l'accumulation de lipides dans le cœur appelée aussi stéatose cardiaque. Comme aucun système cellulaire ou bioinformatique ne peut reproduire la complexité d'un organisme qui est le siège de régulations variées, complexes et pas nécessairement bien appréhendées, il est nécessaire de modéliser cette pathologie humaine *in vivo*, dans un modèle murin.

Nous avons fait le choix d'étudier ce phénotype de stéatose cardiaque à l'aide d'un nouveau modèle de souris transgénique. Des molécules de référence pourront être administrées aux souris afin de comprendre les mécanismes moléculaires et biochimiques de la maladie. Les fonctions cardiovasculaires chez cette souris seront explorées de manière non-invasive par échographie trans-thoracique chez l'animal anesthésié. Cette évaluation échographique inclue les mesures de la fonction et du remodelage cardiaque (ventricules et oreillettes) mais aussi celles des artères. Différentes prises de vue avec plusieurs modes d'acquisition d'images sont pratiquées afin d'évaluer les fonctions cardiaques. Les fonctions métaboliques seront quant à elles explorées sur des prélèvements sanguins et/ou urinaires.

Les fonctions cardiovasculaires chez cette souris seront explorées de manière non-invasive par échographie trans-thoracique chez l'animal anesthésié. Cette évaluation échographique inclue les mesures de la fonction et du remodelage cardiaque (ventricules et oreillettes) mais aussi celles des artères. Différentes prises de vue avec plusieurs modes d'acquisition d'images sont pratiquées afin d'évaluer les fonctions cardiaques. Les fonctions métaboliques seront quant à elles explorées sur des prélèvements sanguins et/ou urinaires

Dans cette étude les mâles et les femelles seront étudiés. Une étude biostatistique permettra de définir le nombre minimal d'animaux nécessaires pour mettre en évidence des effets biologiquement significatifs en fonction de l'objectif de l'étude, du schéma expérimental, de la variabilité des paramètres mesurés et contribuera à optimiser les méthodes expérimentales employées. Le nombre maximal d'animaux qui sera utilisé dans le cadre de ce projet est de 768 souris sur 2 ans.

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et à la prévention de la douleur et du stress.

6266. Dans le but de faciliter l'administration par voie orale chez le chien d'un médicament ou d'un nutraceutique en cours de développement, la prise volontaire, et donc l'appétence du produit, est primordiale. Un produit qui doit être mélangé à la nourriture n'est pas considéré appétent.

L'appétence des produits peut être améliorée par l'ajout de composés odorants, bien que ce ne soit pas toujours nécessaire, ce qui se traduit par une meilleure prise spontanée par les animaux et facilite ainsi la bonne observance du traitement par le propriétaire. Pour pouvoir revendiquer l'acceptance/appétence (ou palatabilité) du produit, des études appropriées sont requises puisque la référence à la seule composition n'est pas suffisante pour garantir l'appétence. En effet, la forme, la texture, la taille, la dureté ou encore l'odeur du produit peut influencer sur la bonne acceptabilité du produit par l'animal et donc sa consommation spontanée.

La prise spontanée peut être évaluée sur une prise unique ou sur des prises répétées, l'étude sera alors dénommée acceptance ou appétence respectivement.

L'objectif du projet (dénommé par la suite protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études d'acceptance/appétence chez le chien dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R, afin d'évaluer la consommation spontanée par l'animal du produit en développement. Plusieurs études d'acceptance/appétence pourront être requises pour répondre à l'ensemble des questions posées selon l'état d'avancement du développement du produit, selon le schéma posologique envisagé, avec une présentation unique ou des présentations répétées du produit au même animal.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables pour revendiquer l'acceptance/appétence du produit. Ces études d'acceptance/appétence doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le chien, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études d'appétence. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon le schéma posologique (administration unique ou sur le long terme) du produit testé, et selon les exigences des textes réglementaires et les recommandations des lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux pour ce projet n'excèdera pas 300 animaux.

L'acceptance/appétence étant évaluée par la prise spontanée du produit à tester par l'animal, aucun traitement n'est imposé à ce dernier.

Toutes les présentations de produits seront réalisées conformément aux procédures en vigueur au sein de l'Union Européenne (UE) et aucun produit n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal.

- les animaux seront suivis quotidiennement depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude 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. Toute observation laissant présager un début de mal-être ou l'atteinte des points limites (changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit ou de poids dans les jours suivant la consommation du produit) sera immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger celui-ci.

Les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

6267. Dans le cadre de la recherche et du développement des médicaments vétérinaires destinés à être administrés au chien, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme de celui-ci (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 chien dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3R, afin d'établir le profil pharmacocinétique du produit en développement et évaluer sa biodisponibilité. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement de la molécule.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le chien, jeune ou adulte. Le projet comprendra plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclus 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 (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 pour ce 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 chien 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.

Tous les traitements et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'Union Européenne (UE) et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal.

Les animaux seront suivis quotidiennement depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude. Toute observation laissant présager l'atteinte des points limites (changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit, perte de poids, dans les jours suivant la pharmacocinétique) est immédiatement signalée au vétérinaire qui prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal ; les animaux seront alors soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance. Les conditions d'hébergement seront adaptées aux besoins physiologiques des animaux.

Les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

Ce projet permet 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.

6268. Les traumatismes sévères ou les résections de tumeurs osseuses nécessitent des reconstructions du squelette. L'os est le tissu le plus transplanté chez l'homme avec 1 million de transplantation chaque année en Europe. Cependant, la transplantation d'une greffe osseuse nécessite un second site chirurgical et le stock osseux du patient est limité. Les biomatériaux à base de phosphate de calcium sont largement utilisés pour le comblement de pertes osseuses, notamment en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Or, ces biomatériaux ne possèdent pas de propriétés d'ostéo-induction pour régénérer des défauts osseux de taille critique. Les cellules souches stromales mésenchymateuses humaines sont des cellules multipotentes capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes. L'ingénierie tissulaire osseuse consiste à cultiver des cellules souches stromales mésenchymateuses (CSM) humaines sur des biomatériaux synthétiques à base de phosphate de calcium biphasés afin de leur conférer des propriétés ostéogéniques. En associant des cellules souches humaines et des particules de céramiques de phosphate de calcium biphasé (BCP), nous avons mis en évidence l'induction d'une différenciation ostéoblastique *in vitro*. Il nous est nécessaire de confirmer cette différenciation par la formation d'un tissu osseux en site ectopique chez l'animal avant d'envisager des essais cliniques. Cette approche d'ingénierie tissulaire pourrait constituer une alternative à la greffe osseuse autologue pour régénérer de grands défauts osseux.

Le but de ce projet est d'évaluer le potentiel ostéogénique de cellules souches stromales de différentes origines (ex. moelle osseuse, tissu adipeux, fosse nasale), de déterminer les meilleures conditions de culture de cellules souches mésenchymateuses humaines ou encore d'évaluer différents biomatériaux afin de permettre une formation osseuse ectopique. Le site ectopique sous cutané permet de s'affranchir de l'influence de la capacité de régénération naturelle du tissu osseux afin d'isoler les conditions de culture les plus favorables à l'ostéogénèse.

Les souris Nude sont d'un grand intérêt pour cette étude car elles permettent l'emploi de cellules humaines sans phénomène de rejet. Par ailleurs deux implants dorsaux sous cutanés peuvent être posés par souris, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires à une analyse statistique satisfaisante des résultats. Au cours de ce projet, 600 souris maximum seront utilisées (sur 5 ans).

Les animaux seront hébergés en armoire ventilée, par groupe de 5 sur copeaux. La procédure chirurgicale étant modérée, un analgésique est injecté en site intra musculaire avant la chirurgie et 2 fois/jour pendant 3 jours. Les animaux sont surveillés pour les signes de douleurs (alimentation, comportement) et de cicatrisation pendant 5 jours. En cas de point limite, l'animal est euthanasié.

Après 8 semaines d'implantation, les animaux seront euthanasiés.

6269. Les autorités de santé vétérinaires demandent la démonstration de l'activité sérologique des lots commerciaux de chaque vaccin ou formule vaccinale via des contrôles qualité qui a pour finalité l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). De ce fait, la sécurité des vaccins doit être évaluée sur des modèles animaux.

Objectifs :

Ce projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires selon les éléments du dossier d'AMM correspondant aux vaccins à contrôler. Les tests ont pour but de garantir l'activité sérologique ou de l'identité de vaccins destinés aux animaux de rente. Ils garantissent également la sûreté, l'efficacité et la qualité du produit pour ces derniers. Par ailleurs, ils permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Une équivalence entre les modèles animaux (espèce cible et espèce alternative) a été définie. Ceci permet d'utiliser les modèles rongeurs et d'éviter le recours aux espèces cibles afin de garantir une commercialisation de vaccins efficaces et sûrs.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour la mise sur le marché de lots commerciaux. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays.

Réduction : le nombre, le statut et le sexe des animaux utilisés sont imposés par la réglementation des pays ou par la Pharmacopée. Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage nous utiliserons, au maximum, 2000 lapins, 2500 cobayes et 7 000 souris sur 5 ans. Le nombre utilisé varie d'année en année en fonction du nombre de lots de vaccins ou formules vaccinales à tester et des réglementations des différents pays destinataires.

Raffinement : dans ce projet, seule une douleur minime et un léger stress, dus aux injections des vaccins, aux prélèvements sanguins et aux manipulations, peuvent survenir. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal ne serait plus dans sa zone de confort et mettre tout en œuvre pour lui éviter toute souffrance.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux afin d'améliorer au maximum leur confort et leur bien-être. Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

6270. La transplantation d'organe est la seule issue thérapeutique pour la plupart des pathologies conduisant à une perte irréversible de la fonction des organes vitaux. Le greffon, l'organe transplanté, est étranger à l'organisme du receveur et engendre une réaction immunitaire dite de « rejet », aigu ou chronique, qui reste la première cause de perte de fonction du greffon à long terme. L'incidence de rejet aigu à un an après transplantation varie entre 10% (rein) et 50% (poumon) (source : Inserm). Afin d'assurer la réussite d'une transplantation (à savoir prévenir et minimiser les rejets et garantir une survie à long terme des greffons), le patient est soumis à un traitement immunosuppresseur visant à déprimer son système immunitaire. Ces traitements diffèrent en fonction de la période après la greffe. Parmi les traitements dit "d'induction" administrés immédiatement après la greffe, les plus largement utilisés demeurent les Sérum Anti-Lymphocytaires (SAL) ou Immunoglobulines (IgG) Anti-Lymphocytes ou Anti-Thymocytes (ATG, Anti-Thymocyte Globulin).

Ces anticorps sont produits par l'immunisation d'animaux (IgG de lapin actuellement commercialisées) contre des antigènes lymphocytaires humains. Cependant, ce traitement entraîne de nombreux effets secondaires liés à l'immunisation des receveurs contre les antigènes « animaux » (ou xéno-antigènes), parmi lesquels la maladie sérique (MS) qui associe fièvre, arthralgies, et lésions au niveau de la greffe. Des travaux récents ont montré une relation entre la MS et une survie écourtée du greffon et caractérisent plusieurs antigènes impliqués dans la survenue de cette MS. Ces travaux ouvrent la possibilité de produire un SAL innovant produit dans l'espèce porcine, par l'immunisation de porcs knock-out pour certains xéno-antigènes majeurs. Ces IgG seraient capables de limiter la survenue des effets indésirables et parfois très graves. Cette innovation de production fait l'objet d'un brevet.

Le projet présente a pour but de valider *in vivo* l'efficacité et d'évaluer l'éventuelle toxicité de ces IgG chez le primate non humain (PNH), avant d'évaluer leur efficacité chez l'homme. Les IgG ont préalablement été testées et validées dans des expériences *in vitro*, notamment pour l'activité cytotoxique et la cross-réactivité sur cellules de PNH. En effet, seuls les primates ont montré une cross-réactivité suffisante *in vitro*, lors de tests comparatifs avec d'autres espèces (souris, rat, lapin...).

L'objectif principal de ce projet est :

- i) de valider la cross-réactivité de ce nouveau SAL *in vivo* sur un modèle animal proche de l'homme : le macaque,
- ii) d'évaluer l'efficacité immunosuppressive de ce SAL sur le système immunitaire d'un animal immunocompétent, et
- iii) de vérifier l'innocuité *in vivo* de cette nouvelle stratégie thérapeutique.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude sera de 12. Dans un souci de respect de la règle des 3R, les études seront effectuées sur deux animaux par groupe : une première dose devrait être testée sur deux animaux, une dose supérieure ne sera testée seulement si la dose précédente ne permet pas d'obtenir des résultats escomptés, ainsi le nombre d'animaux initialement prévu pourra être revu à la baisse au cours du protocole.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, tous les protocoles de ce projet seront réalisés chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure. La fréquence d'observation des animaux est doublée lors des expérimentations et consiste en des examens cliniques de l'animal notés sous forme de score clinique selon une échelle préétablie, permettant une prise en charge individuelle et adaptée.

Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

6271. Le cancer du sein (tumeur primaire) est une tumeur maligne qui peut se propager dans tout l'organisme : on dit alors qu'elle métastase. De manière très particulière, les cellules de cancer du sein migrent préférentiellement à l'os et on parle alors de métastases osseuses. Elles sont responsables d'une destruction massive de l'os et sont dites alors ostéolytiques. Ces métastases ostéolytiques génèrent de grandes douleurs et des fractures pathologiques et peuvent même engager le pronostic vital des patientes. A l'heure actuelle, les métastases osseuses sont incurables et les traitements sont donnés uniquement pour améliorer la qualité de vie des patientes. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par le biais desquels les métastases dérivant d'un cancer du sein se forment afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Robo4 est une protéine qui est habituellement impliquée dans le développement des neurones mais des travaux réalisés au laboratoire ont montré qu'une forme non-glycosylée de Robo4 était aussi surexprimée dans des cellules cancéreuses dites ostéophiles (littéralement aimant l'os). C'est aussi un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer du sein lorsqu'il est détecté chez les patientes. Nous avons donc émis l'hypothèse que Robo4 pouvait jouer un rôle dans la formation des métastases osseuses dérivant d'un cancer du sein. L'objectif majeur de ce projet est de déterminer les conséquences d'une déplétion du récepteur

Robo4 dans les mécanismes de migration, de colonisation et d'ancrage des cellules tumorales au site osseux chez la souris. Ceci sera rendu possible par l'injection des cellules tumorales avec ou sans la protéine Robo4 dans la circulation sanguine ou bien directement dans la cavité osseuse afin d'observer les métastases osseuses. Des résultats encourageant, *in vitro*, nous ont déjà permis d'observer une diminution de l'interaction entre les cellules cancéreuses déplétées en Robo4 et les cellules présentes dans l'os. Ce protocole permettra de confirmer ces données *in vitro* et apportera également une ouverture sur le développement clinique de thérapie ciblant ce récepteur afin de prévenir et d'inhiber la dissémination et la croissance des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse à travers l'inhibition de Robo4.

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

**Remplacement :** L'influence que peut avoir le récepteur Robo4 sur des phénomènes tumoraux tels que la migration, la colonisation et l'ancrage osseux lors de la formation des métastases ne peut pas être exclusivement appréciée par des tests *in vitro*. En effet la courte durée des protocoles ne permet pas l'observation de lyse osseuse ou l'apparition d'autres symptômes autres que ceux dues à l'injection elle-même. L'utilisation d'une lignée cellulaire d'origine humaine chez la souris permettra de reproduire le plus fidèlement possible un cas pathologique clinique (cancer du sein). De ce fait des souris femelles consanguines seront utilisées.

**Réduction :** Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra un nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un groupe expérimental contiendra 10 souris. Un nombre total de 60 souris sera donc nécessaire.

**Raffinement :** Les souris cohabiteront par groupe de 5 dans un environnement enrichi (maison rouge, coton) renouvelé une fois par semaine. Afin de permettre l'acclimatation des animaux à leur nouvel environnement, les souris seront placées en stabulation durant une semaine au sein de l'animalerie d'accueil sous surveillance journalière. Les protocoles seront réalisés chez des souris anesthésiées au moment des injections. Afin de limiter la douleur des animaux, les souris seront traitées avec un analgésique systémique et un anesthésique local lors de tous gestes chirurgicaux. L'état de bien être des souris sera évalué quotidiennement par l'observation des principaux signes physiologiques (augmentation du rythme cardiaque et respiratoire), comportementaux (perte de poids) et de l'apparence de l'animal (état du pelage).

6272. La cicatrisation des plaies cutanées est un phénomène naturel de reconstruction de la barrière cutanée mais si les plaies sont mal soignées, cela peut aboutir à des complications. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition de la lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines. On distingue 4 stades dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées, faisant suite à une phase inflammatoire au cours de laquelle la lésion est recouverte par un caillot sanguin : (1) l'angiogenèse avec formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants par bourgeonnement, permettant l'apport en nutriments et oxygène, indispensables aux cellules, (2) la phase de migration au cours de laquelle le caillot sanguin devient une croûte en raison de la prolifération des filaments de fibrine, c'est le début de l'élaboration de la cicatrice, et sous la croûte les vaisseaux vont proliférer, (3) la phase de prolifération massive de cellules, de vaisseaux sanguins et de fibres, et enfin (4) la phase de maturation, phase la plus longue qui peut se poursuivre pendant plus d'un an, avec au début la croûte qui tombe et la peau qui va retrouver ses différentes couches.

Il est donc très important de tester de nouvelles substances, de nouveaux pansements ou de nouveaux dispositifs médicaux sur des modèles de plaies simples et chroniques, représentatifs chez l'animal sain et diabétique, qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation de ces plaies. Parmi ces nouveaux produits, il y a des pansements liquides filmogènes, c'est-à-dire formant un film après application sur la plaie, permettant ainsi d'isoler celle-ci de l'eau, des frottements et des bactéries et obtenir une cicatrisation optimale dans les meilleures conditions. Ces pansements liquides filmogènes peuvent être utilisés pour traiter des plaies non ouvertes telles que coupures, griffures, éraflures ou crevasses, toute plaie de chirurgie dermatologique telle que l'ablation d'un grain de beauté, une suture ou une brûlure par cryothérapie, mais également des aphtes ou des boutons de fièvre. Si ces produits permettent de soulager la douleur induite par la plaie, leur application induit une douleur courte mais plus ou moins prononcée en raison de la présence d'alcool (éthanol), nécessaire pour la mise en solution du film et d'autres substances chimiques comme l'acétate d'éthyle, des acides carboxyliques, minéraux... De nouvelles formulations permettant de substituer ou limiter ces substances, sans diminuer le pouvoir cicatrisant, sont donc en cours de développement.

L'objectif de notre projet est d'évaluer les effets d'une nouvelle formulation dermatologique filmogène favorisant la cicatrisation sur 3 modèles de plaies cutanées induites chez la souris *Hairless Skh-1* car ce type d'étude ne peut être effectué sur des modèles *in vitro* (remplacement). Il a également pour but de tester la tolérance et la tenue de la nouvelle formulation au niveau des plaies. Cela permettra de sélectionner le ou les modèles de plaies sur lesquels seront réalisées par la suite des études d'efficacité avec cette nouvelle formulation en comparaison à des formulations neutre (placebo) ou déjà sur le marché (raffinement). La nouvelle formulation contient des substances favorisant la cicatrisation mais également un analgésique permettant de supprimer la douleur liée à la plaie et des substances permettant la formation d'un film protecteur sur celle-ci. Ce projet nécessitera l'utilisation de 24 souris femelles *Hairless Skh-1* âgées de 6 semaines. Après une période de quarantaine et d'acclimatation de 7 jours, les plaies cutanées seront induites sous anesthésie gazeuse : par abrasion superficielle de la peau du dos de 6 souris pour le modèle d'éraflure, par incision cutanée sur le dos de 6 souris pour le modèle d'incision et par biopsie cutanée sur le dos de 12 souris pour le modèle de biopsie. Pour ce dernier modèle, la moitié des animaux sera mis à mort après 7 jours de traitement pour évaluer les effets de la nouvelle formulation sur la phase de prolifération. Chaque groupe expérimental sera donc composé de 6 souris permettant d'avoir un nombre suffisant d'animaux pour mesurer les effets de la formulation testée (réduction). La formulation sera appliquée quotidiennement après induction des plaies cutanées.

Les animaux seront placés en cage individuelle de 560 cm<sup>2</sup> de surface (18,9 x 29,6 cm), 12,8 cm de hauteur, pour éviter qu'ils ne s'arrachent le film formé au niveau de la plaie et pouvoir ainsi évaluer sa tenue, sa tolérance et son pouvoir cicatrisant. Ils disposeront d'une feuille de sopalin dans leur cage comme dispositif d'enrichissement.

L'évolution de la taille de la plaie cutanée induite, le temps nécessaire à sa cicatrisation, ainsi que le poids et les prises alimentaire et hydrique des animaux seront relevés régulièrement pendant toute la durée de l'expérimentation afin de recueillir un maximum d'informations.

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques. A la fin de l'expérimentation, l'ensemble des animaux sera mis à mort par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique.

6273. Le cancer de la vessie est le cancer urologique le plus fréquent après celui de la prostate. Touchant principalement les hommes après 50 ans, ce cancer est d'autant mieux traité qu'il est détecté tôt. Le nombre de cas de cancers de la vessie en France augmente et son incidence le place au 6ème rang par sa fréquence. On compte aujourd'hui près de 10 000 nouveaux cas par an et il représente 3,5% des décès par cancer. Il existe différents types de tumeur maligne de la vessie. Le carcinome transitionnel est la forme la plus fréquente (90 % des cancers de la vessie) suivi par le carcinome épidermoïde (7 %) et l'adénocarcinome (1 %). Les lésions non carcinomateuses correspondent aux lymphomes, sarcomes et tumeurs neuroendocrines de la vessie dont le traitement diffère des carcinomes.

La paroi interne de la vessie est tapissée de cellules transitionnelles qui sont à l'origine de la plupart des cancers de la vessie. L'évolution et la prise en charge dépendent beaucoup du caractère invasif de la tumeur. On distingue le cancer superficiel de la vessie du cancer invasif, lequel, plus agressif, nécessite des traitements plus lourds. Le traitement des tumeurs de la vessie dépend de leur nature et de leur caractère infiltrant ou non et métastatique ou non. Les moyens thérapeutiques sont la chirurgie, la radiothérapie externe, la chimiothérapie et l'immunothérapie avec traitement endo-vésical ou systémique.

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

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de 2 photosensibilisateurs, PC-16 et ALA-X, qui ont été sélectionnés par rapport à leur sélectivité du tissu tumoral précédemment évaluée, et de l'Hexvix® comme traitement de référence, dans le traitement par PDT des tumeurs vésicales chez le rat. Ces expériences ne peuvent être réalisées sur des modèles *in vitro* ou *in silico* (remplacement). 126 rats femelles *Fischer 344* seront utilisés pour ce projet, répartis en groupes de 4 à 8 animaux. Les animaux seront placés à 2 par cage, sans enrichissement du milieu pour comparer les résultats avec les précédentes études effectuées dans les mêmes conditions. L'Hexvix® sera administré par instillation vésicale (par les voies naturelles) à 2 concentrations différentes et les 2 composés PC-16 et ALA-X à une seule concentration, sur des tumeurs orthotopiques de vessie induites chez les animaux 5 jours auparavant. Ces composés ne sont pas génotoxiques pour les cellules, pas toxiques pour les animaux aux doses testées, et ils n'induisent pas d'allergie.

L'induction de tumeurs de vessie est effectuée sous anesthésie par abrasion de la surface de la vessie sur une zone limitée, suivie de l'instillation vésicale de cellules tumorales de vessie d'origine murine. Cinq jours après induction des tumeurs vésicales, les animaux sont à nouveau anesthésiés et chaque composé à tester est administré dans la vessie (instillation) par l'intermédiaire d'un cathéter placé dans l'urètre et laissé au contact de la vessie pendant 1 heure avant réalisation du traitement par PDT avec irradiation en lumière bleue et rouge pour l'Hexvix® et en lumière rouge uniquement pour les 2 composés PC-16 et ALA-X. Les animaux sont mis à mort 4 heures, 48 heures et 1 mois après le traitement par PDT par injection d'une surdose d'anesthésique. La vessie est alors prélevée, fixée ou congelée dans de l'azote liquide pour effectuer les analyses en histologie classique et en microscopie de fluorescence après réalisation de coupes à froid (cryostat). Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduction) mais de permettre une approche statistique des résultats obtenus, les groupes de traitement seront constitués de 4 à 8 rats, et les groupes d'animaux témoins de 4 rats. Les analyses seront effectuées à un stade de développement des tumeurs non invasif, y compris 1 mois après traitement, ce qui limite l'impact de la maladie sur l'animal (raffinement). Pour supprimer la douleur induite éventuellement par l'induction des tumeurs vésicales et par le traitement par PDT, les animaux recevront deux injections sous-cutanées de Buprénorphine sous anesthésie à la fin de l'induction tumorale et 24 heures après induction tumorale, et à la fin du traitement par PDT et 24 heures après traitement par PDT. Les points limites suivis seront l'évolution pondérale des animaux, leur état physiologique (activité, posture, état de la fourrure, tremblements...) et leurs consommations alimentaire et hydrique. En cas d'atteinte d'un point limite, les animaux seront mis à mort par une méthode en conformité avec les recommandations éthiques (injection d'une surdose d'anesthésique).



6274. Dans le cadre des activités de recherche, pour découvrir ou développer de nouvelles solutions thérapeutiques, un certain nombre d'étapes nécessitent le recours à l'animal de laboratoire. Les protocoles *in vitro* et *ex vivo* permettent de limiter le nombre d'études sur animaux, mais nécessitent néanmoins de disposer de fluides biologiques, tissus et/ou organes.

Ce projet décrit les modalités de prélèvement de fluides biologiques, tissus et/ou organes. Les prélèvements réalisés dans ce cadre serviront notamment à la mise en culture de cellules, à l'étude de tissu isolé, à la validation de dosages (ex : paramètres sanguins ou urinaires) et contribueront ainsi à la qualité de la sélection de candidats médicaments et des analyses d'échantillons d'études. Afin de réduire le nombre global d'animaux utilisés dans notre Centre de Recherche, les prélèvements seront réalisés en priorité sur des animaux provenant d'autres projets (réutilisation). Cela sera systématiquement le cas pour les prélèvements réalisés sur les chiens et les primates non humains après avis favorable vétérinaire. Le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans, ayant été défini à partir de l'historique des besoins identifiés au sein des différentes équipes de recherche, sera au maximum de : 500 souris, 500 rats, 100 cobayes, 200 lapins, 150 chiens et 200 primates non humains.

Les prélèvements seront réalisés par du personnel dûment formé à ces techniques, tout en respectant les recommandations éthiques internes spécifiques à chaque espèce relatives aux modalités d'hébergement, d'enrichissement du milieu, d'expérimentation et visant à prévenir toute douleur ou détresse de l'animal. Ainsi, selon les particularités liées aux espèces et/ou aux modalités des prélèvements, seront privilégiés les hébergements en groupe avec enrichissements structurels, les habituations aux manipulations et l'utilisation de moyens analgésiques et/ou d'anesthésiques appropriés, si nécessaire.

6275. Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils représentent une source potentielle de réactions indésirables comme une réponse fébrile ou des réactions de toxicité systémique.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordial pour y parvenir intégralement. En effet, aucune méthode alternative validée ne permet d'évaluer la pyrogénicité avec un large champ de détection (le test LAL permettant d'identifier uniquement la pyrogénicité véhiculée par des endotoxines) ou la toxicité systémique d'un produit en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs (souris, cobayes) et de lapins. Le nombre d'animaux est défini dans les textes de référence (ex : pharmacopée européenne...). Par an, jusqu'à 2150 animaux peuvent être utilisés dans le cadre de ce projet.

Tous les animaux bénéficient d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des essais.

Enfin, les animaux grégaires sont hébergés en groupe dès que possible ; des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus dans tous les cas ; des chaînettes peuvent être suspendues aux cages des lapins pour qu'ils puissent se divertir et de la musique est diffusée dans les salles d'hébergement.

6276. L'hippocampe est une région profonde du cerveau des mammifères qui joue un rôle majeur dans la mémorisation et l'apprentissage, phénomènes impliquant des remaniements des connexions entre les neurones. En effet, ces connexions appelées synapses sont extrêmement plastiques. Lors d'un apprentissage, leur nombre et leur forme sont modifiés. Cette plasticité synaptique est cruciale car elle permet de réguler la transmission entre les neurones. Ainsi, étudier la forme et l'évolution de ces synapses au cours du temps est essentiel pour comprendre les mécanismes impliqués dans la mémorisation et l'apprentissage. Cependant très peu de données sont disponibles sur des animaux vivants. En effet, les techniques de microscopie classique n'offrent pas une résolution suffisante pour visualiser les synapses *in vivo*. Grâce au développement récent de l'imagerie optique à haute résolution, il est maintenant envisageable d'étudier ces structures au sein de l'hippocampe dans un contexte le plus physiologique possible, c'est-à-dire sur animaux vivants.

Notre projet vise, dans un premier temps, à établir l'imagerie à haute résolution *in vivo* afin de caractériser le comportement des synapses de l'hippocampe au cours du temps chez la souris. Pour ce faire, les animaux seront équipés d'un dispositif afin d'imager ces synapses sur plusieurs jours. Ceci permettra pour la première fois de visualiser et d'étudier la dynamique des synapses *in vivo* sur animaux vivants. Dans un second temps, nous étudierons les remaniements des synapses induits lors de l'apprentissage et la mémorisation. Pour ce faire, des animaux sains ou atteints de la maladie d'Alzheimer réaliseront des tests de mémorisation spatiale ; la forme et le nombre des synapses seront alors évalués par des séances d'imagerie. Cette seconde partie fera l'objet d'une autre demande d'autorisation. À noter que ce lien entre les modifications morphologiques des éléments synaptiques et l'altération de leur fonction, ne peut être étudié avec des modèles *in vitro* de neurones en culture. Dans ce projet, 55 souris transgéniques seront utilisées. La qualité de la mise en œuvre des procédures (expertise reconnue de l'expérimentateur) garantira le respect du bien-être animal et permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. De plus, l'utilisation de l'imagerie photonique chronique permettra de réduire le nombre d'animaux au moins par deux, puisque chaque souris sera son propre contrôle. Enfin, les douleurs liées aux procédures chirurgicales seront scrupuleusement contrôlées et soulagées par des molécules anesthésiques et antalgiques efficaces.

À terme, ce projet tout en respectant la règle des 3R, permettra non seulement de mieux comprendre le fonctionnement de la mémorisation et de l'apprentissage mais également d'envisager de nouvelles stratégies dans le traitement de certaines pathologies du cerveau comme la maladie d'Alzheimer.

6277. Depuis 2003, le cancer est la principale cause de décès en France et l'incidence ne cesse d'augmenter. La plupart des chimiothérapies anticancéreuses sont des molécules très agressives pour l'organisme, limitant ainsi l'augmentation des doses administrées de celles-ci et donc améliorer leurs résultats thérapeutiques. Plusieurs études démontrent que l'incorporation des médicaments dans des petits véhicules de taille nanométrique (milliardième de mètre) permet d'augmenter la quantité des molécules actives en les protégeant de la dégradation par les enzymes de l'organisme qui est généralement très rapide lorsque la molécule est sous sa forme libre. Ce système permet, entre autres, de diminuer les doses administrées par protection de la molécule active lors de son transport dans le sang.

Le projet global de l'équipe est de fabriquer de nouvelles formes de médicaments injectables de type nanoparticules contenant des molécules à visée thérapeutique, notamment dans le domaine du cancer.

Cette étude porte plus particulièrement sur les nanoparticules à base de polyester qui sont des vecteurs très intéressants car ils sont biocompatibles et biodégradables, si on respecte certaines doses. Le couplage chimique de polymères de polyester à des petites molécules médicamenteuses permet d'obtenir des nanoparticules, et ainsi d'injecter par voie intraveineuse des molécules normalement instables sous leur forme libre. De plus, il a été observé que ce procédé de conjugaison permettait d'améliorer la pénétration intracellulaire des principes actifs.

Afin de connaître et de maîtriser les quantités de principe actif circulant dans le sang et internalisées par les organes après injection des nanoparticules chargées, de la pharmacocinétique et de la biodistribution est essentielle. Cette étude permettra d'ajuster de la molécule active injectée, d'optimiser l'effet thérapeutique significatif tout en évitant les phénomènes de toxicité. Ces études de pharmacocinétique et de biodistribution n'ont jamais été faites sur ces nanoparticules car ce sont des vecteurs innovants développés au sein du laboratoire. Ces nouveaux vecteurs apporteront un réel bénéfice aux traitements contre le cancer en protégeant la molécule active de l'environnement biologique (diminution des doses injectées et des effets secondaires) et en l'adressant au niveau des cellules cancéreuses (augmentation de l'efficacité thérapeutique).

Malgré l'effort constant de développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation sur les animaux, il existe des questions, notamment concernant la pharmacocinétique et la biodistribution des médicaments auxquelles il n'est pas possible de répondre autrement que par des études sur des organismes entiers. Seule une étude chez l'animal permettra d'évaluer l'interaction des nanomédicaments avec les composants du sang, de prendre en compte la réponse du système immunitaire suite à l'injection de nanoparticules et leur passage de la circulation sanguine vers les organes.

Pour réaliser cette étude, ces polymères de polyester seront couplés chimiquement à des petites molécules médicamenteuses marquées radioactivement (gemcitabine, adénosine, doxorubicine). Le dosage du nanomédicament se fera par comptage de la radioactivité à différents temps dans le sang et les organes.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations ; seulement un nombre limité de formulations sera testé *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre d'animaux utilisés. Une planification statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude. Pour la réalisation de l'étude de pharmacocinétique et biodistribution nous utiliserons des souris. On prévoit d'effectuer 4 études de pharmacocinétique et biodistribution par an ce qui correspond à un nombre total estimé de 2240 souris sur 5 ans.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également d'importance : les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'individus compatibles et leur surveillance durant la procédure sera effectuée dans des conditions soigneusement contrôlées afin de s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

6278. Malgré des efforts considérables pour lutter contre le cancer et trouver un traitement efficace, cette pathologie reste l'une des principales causes de décès chez l'homme dans le monde et en France. Les cellules tumorales, possèdent un fort potentiel à envahir et à coloniser des organes secondaires comme les poumons, le foie, les os... processus communément appelé métastase. Ce potentiel métastatique est fortement influencé par l'environnement, et notamment par des cellules appelées fibroblastes. En effet, au cours du développement de la tumeur, l'environnement est fortement modifié par ces fibroblastes le rendant alors propice à la progression tumorale. Parallèlement, pour soutenir le développement tumoral, les cellules cancéreuses, mais aussi les fibroblastes environnants ont un besoin accru en énergie. Pour faire face à cette demande, ces cellules modifient et adaptent leurs besoins énergétiques, notamment en utilisant de nouvelle source d'énergie comme la glutamine. Le but de ce projet est d'étudier comment les fibroblastes et les cellules cancéreuses s'entraident pour faire face aux besoins énergétiques accrus et permettre ainsi la progression du cancer dans des modèles murins à forte relevance clinique. Par des expériences en trois dimensions (3D) *in vitro*, nous avons montré que les fibroblastes utilisent la glutamine pour produire une source d'énergie cruciale à la croissance des cellules tumorales : l'Aspartate. Par ailleurs, nous avons montré que les cellules tumorales utilisent la glutamine pour produire une source d'énergie indispensable au fonctionnement des fibroblastes : le glutamate. Nos résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* démontrent que des molécules inhibant l'utilisation de la glutamine et du glutamate par les fibroblastes et de la glutamine et de l'aspartate par les cellules tumorales bloquent la progression tumorale. Néanmoins, nos connaissances actuelles s'appuient principalement sur des résultats obtenues *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de cancer. L'utilisation de tels modèles est un prérequis inconditionnel au développement des thérapies chez l'Homme. Toutefois, nous savons que l'utilisation de tels modèles n'est pas suffisante pour garantir le succès clinique des traitements. Dans ce contexte, nous nous proposons d'étudier les effets de ces molécules dans des modèles murins à forte relevance clinique. Pour cela, nous utiliserons un modèle de greffe de tumeur humaine sur des souris immunodéprimées par injection sous anesthésie générale. En effet, ce modèle de greffe permet d'aborder toute la complexité des tumeurs humaines et des interactions avec son environnement. Pour les besoins de l'étude, les souris seront implantées avec des cellules tumorales issues de fragments de tumeurs humaines,

fraîchement isolés obtenus suite à une résection chirurgicale. Cette étude permettra de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de patients atteints de carcinomes agressifs que sont les carcinomes pulmonaires et les carcinomes de la tête et du cou.

Aussi souvent que possible, les expériences ont été et seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture (Remplacement). Cependant, la complexité d'une tumeur, de part la présence de nombreux types cellulaires d'origine différente, rend la reconstitution *in vitro* d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Pour répondre aux exigences des 3R, Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir du nombre minimum d'animaux (Réduction). Le nombre total d'animaux impliqués dans ce projet est 320. Les souris seront sacrifiées 21 jours après implantation ou lorsque un des points limites sera atteint. Les points limites sont définis par un volume tumoral maximal de 1.5cm<sup>3</sup>, une ulcération de la tumeur, ou toute tumeur pouvant interférer avec l'activité de l'animal (toiletage, gêne pour se mouvoir, se nourrir...). Le suivi quotidien des animaux sera assuré grâce à une fiche de score permettant de surveiller objectivement l'état des animaux. Les expériences seront effectuées en limitant le niveau de stress des souris, en particulier, en limitant au maximum les animaux isolés pendant l'expérimentation. Par ailleurs, un soin particulier sera apporté à l'enrichissement de l'environnement (Raffinement).

6279. Le traitement du cancer, première cause de mortalité en France et dont l'incidence ne cesse d'augmenter, se heurte à l'heure actuelle à de nombreuses problématiques. La plupart des chimiothérapies anticancéreuses conventionnelles présentent en effet une toxicité systémique importante limitant ainsi l'augmentation des doses administrées et donc des résultats thérapeutiques. Les nanomédicaments, qui incorporent des molécules médicamenteuses dans des véhicules de taille nanométrique, représentent un espoir important pour le traitement de cette pathologie de part leur capacité à cibler des cellules ou des tissus malades. C'est dans ce contexte qu'a été développé le concept de « squalénisation », qui consiste à coupler de façon covalente le squalène (intermédiaire hydrophobe de la synthèse du cholestérol) à une molécule biologiquement active afin de conférer au bioconjugué correspondant la capacité de s'auto-organiser sous forme de nanoparticules en milieu aqueux. La preuve de concept a été réalisée en utilisant la gemcitabine comme molécule anticancéreuse modèle. Les précédentes études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'efficacité anticancéreuse de ces nanoparticules de gemcitabine est bien supérieure à celle de la gemcitabine libre. Cependant, pour espérer le passage de ce nanomédicament prometteur en clinique, il est indispensable de connaître son devenir après injection intraveineuse. Il est notamment essentiel de vérifier l'absence d'accumulation de la forme nanoparticulaire dans le foie, qui pourrait être à l'origine d'une toxicité hépatique importante incompatible avec l'administration chez l'Homme. L'objectif de ce travail est donc de visualiser, par imagerie de fluorescence en temps réel, le désassemblage *in vivo* des nanoparticules de gemcitabine-squalène et leur répartition dans l'organisme après injection intraveineuse chez la souris. Pour cela on formulera des nanoparticules de gemcitabine-squalène contenant en plus des sondes fluorescentes.

L'expérimentation *in vivo* s'avère indispensable car l'étude de la distribution et de l'éventuelle accumulation hépatique des nanomédicaments ne peut se faire qu'à l'échelle d'un organisme entier. De plus, dans notre cas, seules des expériences *in vivo* nous permettraient de prédire le devenir des nanomédicaments après administration chez l'Homme.

L'expérience a été conçue pour respecter le principe des 3R. Des études préliminaires ont déjà été réalisées pour formuler et caractériser les nanoparticules de gemcitabine-squalène contenant les sondes fluorescentes, et des études de stabilité *in vitro* ont montré la faisabilité de l'utilisation de la fluorescence pour évaluer le désassemblage des nanoparticules. Pour ces expériences, le nombre de souris nécessaire sera réduit au minimum tout en permettant une analyse fiable de nos résultats. Ces études qui dureront à chaque fois 48h nécessiteront l'utilisation de 48 souris. Le bien-être des animaux sera respecté. Les animaux seront suivis de façon journalière pour détecter précocement tout signe de douleur ou de stress. Ils seront hébergés par 4 dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogène. Par ailleurs, un enrichissement du milieu sera également mis en place.

6280. La tomographie par émission de positon (TEP) est une technique d'imagerie médicale non invasive qui repose sur la détection de molécule radioactive émettrice de positons. En oncologie, la majorité des examens TEP utilise un seul radio traceur pour le diagnostic du cancer, le [18F]-2-fluoro-2-désoxy-D-glucose ([18F] FDG). Malgré son utilisation courante, le [18F] FDG, qui est un analogue du glucose présente certaines limites lorsqu'il est appliqué à l'imagerie tumorale, notamment par son absorption par les cellules inflammatoires et son accumulation cérébrale importante. C'est pourquoi depuis quelques années, de nombreux radiotraceurs ont été développés à la recherche d'une plus grande spécificité tumorale.

Les inositols (cyclohexanehexols) sont une famille de molécules organiques impliqués dans divers processus biologiques. Il existe 9 conformations différentes des inositols, avec pour chaque type une activité spécifique de messagers cellulaires. Leurs interactions avec des transporteurs membranaires leurs permettent d'agir au niveau des cellules saines mais aussi au niveau des cellules malignes. En effet, certains dérivés d'inositols ont montré une action anticancéreuse en particulier en combinaison avec un traitement de chimiothérapie indiqué dans le cancer du sein chez des patientes. Il est vite apparu l'intérêt du développement des dérivés d'inositols en tant que produits radiopharmaceutiques dans l'application « théra-diagnostique » du cancer du sein par imagerie TEP. Le projet préclinique prévoit de réaliser le radiomarquage de 9 dérivés d'inositols avec le radioélément 18F, choisi pour ses propriétés nucléaires pratiques d'utilisations.

L'utilité d'un radiotraceur en imagerie TEP est le suivi *in vivo*, rendant les méthodes alternatives à l'expérimentation animale non applicable (remplacement). Un total de 45 souris, répartie en 9 groupes de 5 souris sera nécessaire pour l'étude du potentiel diagnostique des 9 dérivés inositols avec un examen de comparaison au 18F-FDG sur les mêmes animaux (double examen TEP)

(réduction). Les techniques d'imageries que nous utiliserons sont non invasives ce qui permet de réduire les souffrances de l'animal (raffinement).

De plus, les animaux seront observés quotidiennement, si l'animal présente un signe de douleur et/ou de détresse (animal isolé, moribond, léthargie, avec vocalises, absence de toilettage, avec une perte de poids >20% sur 72H, ou un volume tumoral > 1200mm<sup>3</sup>), l'animal sera mis à mort en accord avec notre structure du bien-être animal et selon la réglementation en vigueur.

6281. L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie grave, caractérisée par une élévation de la pression artérielle pulmonaire qui conduit à une hypertrophie cardiaque droite, puis à une insuffisance cardiaque droite, à l'origine du décès des patients. Les traitements disponibles actuellement ne sont pas curatifs. La recherche est donc très active dans l'identification de nouvelles cibles afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques à visée curative. Pour cela, des modèles animaux pertinents sont indispensables. L'objectif de ce projet est donc d'utiliser des modèles animaux (rats, souris) d'HTP expérimentale classiquement utilisés dans la littérature et au laboratoire de façon à pouvoir s'appuyer sur de nombreuses données déjà acquises. Il existe différents type d'HTP chez l'homme et nous allons donc utiliser deux modèles animaux pour étudier d'une part l'HTP associée à une hypoxie chronique (HC) similaire aux HTP associées aux maladies respiratoires hypoxémiantes (asthme, bronchite chronique, fibrose...) et d'autre part, l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) induite par une injection de monocrotaline (MCT) pour étudier l'HTAP idiopathique (de cause inconnue). Pour cette étude, nous avons besoin de 170 rats/an et 272 souris/an soit au total 850 rats et 1360 souris pour la durée du projet (5 ans). Le nombre d'animaux utilisés apparaît élevé mais 4 statutaires (et leurs étudiants) travaillent sur ce projet. Le rat et la souris sont des espèces classiquement utilisées en recherche et l'utilisation de la souris permet d'envisager l'utilisation de modèles transgéniques.

Pour optimiser le nombre d'animaux utilisés, (1) les rats contrôles utilisés seront les mêmes pour les deux type d'HTP, (2) une planification des expériences sera établie pour optimiser au mieux les techniques réalisées sur chaque animal avec utilisation de cellules en culture. Ainsi, nous utilisons les cellules en culture autant que possible et les remplaçons par les animaux tout en optimisant le nombre de ceux-ci. Par ailleurs, une attention permanente sera portée au bien-être des animaux tout au long du protocole, en particulier par une surveillance quotidienne et par l'enrichissement du milieu. Chez l'homme, l'HTP et HTAP n'induisent pas de souffrance élevée mais plutôt une gêne respiratoire exacerbée lors d'un effort. Etant donné que les animaux ne seront pas soumis à l'effort, la souffrance est considérée comme modérée dans ce type de protocole d'induction d'une maladie.

6282. Le Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) en Génie Biologique option « Analyses Biologiques et Biochimiques » (ABB) prévoit un enseignement pratique dédié à l'expérimentation animale afin de mettre en application les connaissances théoriques dispensées en Physiologie animale et Pharmacologie. L'un des objectifs pédagogiques du DUT ABB est de permettre aux étudiants de s'insérer professionnellement en pharmacologie expérimentale dans des industries pharmaceutiques et des laboratoires publics. A ce titre, la mise en évidence d'activités pharmacologiques sur rats anesthésiés apparaît primordiale car elle constitue une part importante des phases d'essais précliniques dans le développement d'un nouveau médicament. Par ailleurs, « la mise en évidence et la quantification d'une activité pharmacologique *in vivo* » constitue une compétence exigée par le Programme Pédagogique National des IUT.

Pour répondre à cette problématique, ces études sont organisées sur plusieurs séances de travaux pratiques réparties sur l'ensemble des deux semestres de la deuxième année. Le but de ces TP est de permettre aux étudiants d'être initiés aux techniques opératoires sur rats anesthésiés via la mise en place d'un cathéter intraveineux, afin de mesurer et de quantifier l'impact de substances pharmacologiques administrées sur différents paramètres physiologiques (fréquence respiratoire, fréquence cardiaque, pression artérielle...).

Quel que soit le TP considéré, aucun animal n'est réveillé à l'issue de la séance. Il est prévu d'utiliser 180 rats maximum par année universitaire soit 540 rats maximum sur les 3 années du projet. Ce nombre est un compromis nécessaire pour permettre à tous les étudiants de s'impliquer dans cette démarche expérimentale afin de répondre aux exigences techniques du diplôme tout en réduisant au maximum l'utilisation d'animaux en accord avec la règle des 3R (Réduction et Remplacement). Les conditions d'hébergement et d'expérimentation des animaux utilisés sont optimisées afin de s'assurer du bien-être des animaux avant et pendant leur utilisation (Raffinement).

6283. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont de manière prédominante d'origine ischémique. Plusieurs facteurs de risques favorisent le déclenchement de cette pathologie dont l'hypertension artérielle chronique qui représente le facteur de risque le plus important. L'AVC représente la troisième cause de mortalité pour les hommes et la première pour les femmes.

Cette maladie représente aussi la première cause d'handicap acquis chez l'adulte. Malgré les efforts et les progrès scientifiques ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale et la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'efficacité des traitements thrombolytiques reste discutée et celle des traitements pharmacologiques efficaces inexistante en clinique.

En effet, l'efficacité et la marge thérapeutique des traitements pharmacologiques de cette maladie restent considérablement insatisfaisantes. Il est ainsi très important de poursuivre des études précliniques visant à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les AVC.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet d'une intervention thérapeutique sur le volume de la lésion cérébrale mais aussi sur la récupération fonctionnelle à la suite d'une ischémie cérébrale chez le rat. Cette intervention consiste en une stratégie

thérapeutique cellulaire (cellules de la moelle osseuse) combinée à un traitement moléculaire à base d'un agent de la matrice extracellulaire (MEC) injectés après l'induction d'une ischémie cérébrale chez le rat.

Cette étude comprend 3 volets:

1- Détermination de l'effet du traitement combiné : cellulaire (cellules souches mésenchymateuses hétérologues ou de cellules mononucléaires autologues issues de la moelle osseuse) et moléculaire (agent de la MEC) sur les dommages cérébraux et les déficits neurologiques d'origine ischémique.

2- Détermination de l'effet d'une administration répétée du traitement combiné (cellulaire et moléculaire) chez des rats normotendus soumis à une ischémie cérébrale.

3- Analyse de l'effet du traitement combiné (cellulaire et moléculaire) chez des rats hypertendus soumis à une ischémie cérébrale. Le projet nécessite l'utilisation de 182 rats et sera réalisé en suivant le principe des 3R. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum grâce à l'utilisation de techniques d'investigation non invasives. Les explorations seront faites sous anesthésie et analgésie adéquates.

6284. Les complications respiratoires représentent une proportion importante de complication et de mortalité au décours de la chirurgie. Parmi les causes de ces complications, on retrouve les difficultés lors de la gestion des voies aériennes telles que les manœuvres d'intubations trachéales, une impossibilité du maintien de l'oxygénation du patient ou la génération d'un traumatisme des voies aériennes. Il existe une technique alternative innovante qui ne nécessite pas d'intubation trachéale ou d'effort ventilatoire pour maintenir une oxygénation pendant plusieurs dizaines de minutes appelée oxygénation à haut débit.

Cependant certains aspects de cette technique innovante ne sont pas encore connus et empêchent son utilisation optimale. Il s'agit en particulier du paramétrage pour l'administration de l'oxygène ou des conséquences de l'utilisation de cette technique sur la fonction respiratoire.

Ce projet vise à améliorer nos connaissances sur cette modalité d'administration d'oxygène peropératoire afin d'améliorer la sécurité des patients opérés.

L'oxygénation à haut débit peut se faire jusqu'à des débits de gaz de 60 à 70 litre par minute à la condition que les gaz insufflés soient chauffés et humidifiés. Ce conditionnement du gaz peut se faire grâce à différents dispositifs tels que par exemple l'AIRVO 2™ de Fisher & Paykel™.

L'interface d'administration des gaz peut être :

- Le nez
- La bouche
- Une prothèse ventilatoire (trachéotomie ou sonde naso/orotrachéale)

Le patient peut être en ventilation spontanée ou en apnée (oxygénation apnéique).

Les différentes combinaisons possibles d'interface et de statut ventilatoire expliquent l'hétérogénéité des modèles et acronymes retrouvés dans la littérature scientifique.

S'agissant d'une étude pilote sur l'animal, nous ne connaissons pas a priori l'interface idéale d'administration de l'oxygène à haut débit. Nous envisageons de débiter nos expérimentations par une administration Trans nasale de type THRIVE (Trans nasal Humidified Rapid Insufflation Ventilatory Exchange).

Le projet répond aux conditions 3R:

Remplacement: afin d'étudier les critères d'évaluation de la technique d'administration d'oxygène à haut débit peropératoire, il est nécessaire d'utiliser des animaux vivants sous anesthésie générale et le cochon est le modèle le plus répandu dû à sa taille ainsi que sa morphologie.

Réduction: il s'agit d'une étude pilote pour laquelle il n'y a pas de base statistique sur laquelle nous pourrions définir le nombre de cochons nécessaires. Cependant, le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé afin de minimiser la quantité nécessaire. Ainsi, en accord avec le principe de réduction et basé sur notre expérience, nous estimons que 99 cochons seront nécessaires pour cette étude.

Raffinement: il est prévu que toutes les procédures soient effectuées sous anesthésie générale et avec un contrôle de la douleur pendant l'expérimentation. Le protocole d'anesthésie fait appel aux techniques de suivis anesthésiques les plus performantes. Les procédures expérimentales seront réalisées par du personnel qualifié et expérimenté (chirurgiens, anesthésistes et techniciens animaliers) afin d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire le temps interventionnel ainsi que le nombre de cochons nécessaires. Pour améliorer le bien-être de nos animaux avant et lors de nos interventions, nous prenons soin de leur fournir un environnement adapté à chaque phase de l'expérimentation.

6285. Les maladies infectieuses restent aujourd'hui un des principaux enjeux de santé publique. La vaccination a permis de lutter contre de nombreuses maladies, cependant nos connaissances actuelles dans ce domaine sont incomplètes. De meilleures connaissances devraient nous permettre de concevoir de nouveaux vaccins (en particulier contre les pathogènes et maladies qui « résistent » au développement des vaccins comme l'infection par le VIH et le SIDA, l'infection par *Plasmodium* et la malaria ou l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et la tuberculose), d'améliorer les vaccins existants, et d'accélérer le développement de nouveaux vaccins contre des maladies émergentes.

Notre projet a pour but d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires sollicités dans les premières étapes de la réponse aux vaccins car nous pensons que ces étapes précoces influencent leur innocuité et leur efficacité. Le but ultime est de modéliser les étapes biologiques aboutissant à une protection contre les pathogènes, depuis l'injection du vaccin jusqu'à l'établissement de la mémoire du système immunitaire.

Aujourd'hui, le virus de la vaccine atténué, le Modified Vaccinia virus Ankara (MVA), non pathogène en lui-même, est couramment utilisé comme vecteur pour des antigènes provenant d'agents pathogènes (VIH, Plasmodium, Mycobacterium...), afin d'induire une protection contre leurs maladies associées.

Pour mener à bien notre projet, l'animal est irremplaçable. La mise en place d'une immunité et son maintien sont complexes et mettent en jeu de nombreux partenaires cellulaires et moléculaires. Aucune méthode alternative *in vitro* ou *in silico* n'existe à ce jour. Le modèle de primates non humains vaccinés avec le MVA est pertinent. La proximité phylogénétique entre l'homme et l'animal, et en particulier les similarités de leurs systèmes immunitaires, font des primates des modèles expérimentaux de choix en immunologie/ vaccinologie. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet (62) a été réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique robuste des données. Tous sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements agréés. Les réponses immunitaires seront suivies au niveau du site d'injection du vaccin (peau, tissu sous-cutané, muscle), du ganglion lymphatique drainant ce site et dans le sang. Il est nécessaire de connaître précisément l'interaction entre les différentes cellules et molécules mises en jeu lors de cette réaction immunitaire pour maîtriser les différentes stratégies de vaccination.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin et prélèvement de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires ou en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure chargée du Bien-Etre Animal de l'établissement.

6286. Le positionnement et la maturation des neurones dans le cerveau est essentiel au bon fonctionnement de celui-ci. Des défauts dans la régulation de ces processus sont à l'origine de nombreuses pathologies développementales (lissencéphalies,...) ou psychiatriques (autisme, schizophrénie, ...).

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui contrôlent ces processus lors du développement du cortex cérébral.

Pour cela, nous nous focaliserons sur le rôle d'une protéine que nous avons identifiée comme ayant un rôle important dans la morphogenèse des cellules neuronales en culture. Nous voulons à présent étudier le rôle de cette protéine dans l'animal entier afin d'obtenir des informations cruciales sur les mécanismes qui gouvernent la maturation des neurones dans des conditions physiologiques.

Nous utiliserons ainsi l'approche d'électroporation *in utero* qui consiste à introduire un ADN dans des cellules neuronales du cerveau pendant le développement embryonnaire. Cette approche ne peut pas être appliquée sur l'homme directement, et nous devons utiliser des modèles animaux. Nous avons choisi dans notre équipe le modèle des souris car leur cortex cérébral constitue un bon modèle pour comprendre celui de l'homme.

Les souris seront traitées par électroporation *in utero* au 14<sup>ème</sup> jour embryonnaire, afin de modifier le niveau d'expression ou la fonctionnalité de la protéine étudiée dans les neurones de leur cortex cérébral. Les souris seront alors divisées en 2 groupes permettant d'étudier les effets des traitements sur le développement embryonnaire ou post-natal. Au cours de ces deux périodes, les neurones traités sont respectivement en cours de migration puis de maturation.

Le cerveau des souris du groupe utilisé pour étudier le développement embryonnaire sera prélevé 3 jours après l'électroporation, après euthanasie des animaux. Le cerveau des souris du groupe utilisé pour étudier le développement post-natal sera prélevé 18 jours après l'électroporation, après euthanasie des animaux.

Par étude histologique du cerveau des animaux traités, nous pourrions détecter les effets d'une modification d'expression ou de fonction de la protéine étudiée sur la migration et la maturation des neurones corticaux.

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

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

- Réduire. Le nombre d'animaux utilisés est choisi comme le minimum permettant d'établir la significativité statistique des mécanismes étudiés. Nous pouvons utiliser le même animal pour étudier plusieurs paramètres développementaux. Ce projet, prévu sur 3 ans, utilisera 24 souris gestantes et environ 324 embryons, soit un total de 348 animaux.

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

6287. Avec l'augmentation de la disponibilité d'aliments riches en gras et en sucre dans les pays développés, la prise alimentaire semble plus motivée par le plaisir que par le besoin de se nourrir. Ce phénomène, qui consiste à consommer un aliment pour son goût agréable (palatable), apparaît préoccupant puisqu'il peut devenir la cause de troubles alimentaires comme l'obésité. Les activations cérébrales et les adaptations comportementales associées à la surconsommation de nourriture palatable partagent des similitudes avec celles mises en place dans la toxicomanie. La toxicomanie est une maladie du cerveau complexe et récurrente, qui n'est que partiellement comprise. Les changements neurobiologiques sous-jacents à la progression vers une consommation compulsive et une dépendance impliquent notamment des modifications physiologiques et épigénétiques au sein de régions cérébrales associées au circuit de la récompense. Nous nous intéressons particulièrement à une structure du cerveau récemment identifiée comme étant un centre de contrôle inhibiteur du circuit de la récompense, le noyau tegmental rostromédian ou RMTg. Nous souhaitons caractériser l'influence de cette région sur la surconsommation de nourriture palatable.

Le système endocannabinoïde (ECS), cible du cannabis, joue un rôle important dans la prise alimentaire et pourrait être impliqué dans la transition d'une consommation modérée vers une prise excessive de nourriture palatable, pouvant conduire à l'obésité. Nous examinerons les effets d'une surconsommation de nourriture palatable sur l'expression des gènes de l'ECS et leur régulation épigénétique dans le RMTg ainsi que dans les structures cérébrales clés du circuit de la récompense. Nous évaluerons également ces effets sur des régulateurs de la satiété.

Notre projet vise à identifier des neuroadaptations communes entre deux pathologies complexes, l'obésité et l'addiction, aux niveaux neuroanatomique, comportemental et moléculaire. En identifiant des changements durables, notre recherche permettra d'améliorer la compréhension des mécanismes centraux impliqués dans la mise en place des conduites addictives. Finalement, nous espérons que cette étude permettra à plus long terme d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre du traitement de l'obésité. Remplacement : Dans la mesure où nos travaux portent sur la caractérisation neuroanatomique, comportementale et moléculaire d'une région cérébrale peu connue dans la surconsommation de nourriture palatable, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier. Réduction: Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre des analyses statistiques (ANOVA) et avons adapté ce nombre selon le type d'expérience (10 rats par groupe pour les analyses de biologie moléculaire, 15 rats par groupe pour le comportement, 20 rats au total pour les expériences de traçage). Dans ce contexte de la règle des trois R, nous anticipons que ce projet nécessitera au total un maximum de 340 rats. Raffinement: Pour la partie comportementale, nous avons optimisé la durée d'exposition des animaux au régime enrichi en gras et en sucre et les animaux ont systématiquement le choix avec des aliments standard (nourriture et eau). Dans les expériences nécessitant une chirurgie, un suivi particulier des rats sera réalisé avec une surveillance des paramètres physiologiques et comportementaux pouvant suggérer un mal être de l'animal.

6288. La maladie d'Alzheimer (MA) est un syndrome neurodégénératif associé à une démence progressive et irréversible qui s'accompagne fréquemment de symptômes psycho-comportementaux comme la dépression, l'anxiété ou encore l'apathie. Au niveau histologique, la maladie se caractérise par la présence dans le cerveau de dépôts de protéines agrégées : des dépôts extracellulaires, les plaques séniles enrichies en peptide amyloïde (Ab) et des dépôts intracellulaires contenant la protéine Tau hyperphosphorylée. Pour étudier les aspects moléculaires et cellulaires de la MA de manière intégrée, le recours à des modèles animaux est indispensable. A ce jour plusieurs modèles transgéniques murins de la MA ont été créés et présentent de fortes similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris triple transgéniques *3xTgAD (PS1M146V, APP<sup>swe</sup>, TauP301)* que nous utilisons au laboratoire, mime au mieux la MA puisque ces souris développent non seulement les marques histopathologiques de la MA mais aussi des déficits synaptiques et cognitifs qui s'aggravent avec l'âge des souris. Au laboratoire, nous avons observé dans ce modèle, une accumulation précoce d'un fragment pathogène, le C99, qui est le précurseur direct des peptides Ab et AICD. Cette accumulation précoce de C99 est non seulement corrélée aux premiers dysfonctionnements synaptiques mais aussi à un phénotype de type apathique des souris qui se traduit par une forte diminution de leur activité spontanée. Ce fragment C99, indépendamment du peptide Ab pourrait alors être responsable de ce comportement précoce et avoir ainsi, en amont du peptide Ab, un rôle crucial dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer.

Selon l'hypothèse amyloïde, les peptides Ab qui s'accumulent dans les plaques séniles, seraient responsables de la pathologie or nos résultats suggèrent que les fragments C99 et AICD pourraient être tout aussi pathogènes. Afin d'étudier, *in vivo*, la contribution respective de ces fragments dans la pathologie, nous voulons exprimer ces fragments C99 ou AICD dans des souris sauvages (*C57BL/6*) par une approche virale et analyser si ces souris développent au niveau biochimique, électrophysiologique et comportemental un phénotype caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

Nous utiliserons des tailles d'échantillons garantissant une puissance statistique suffisante tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement). Les expériences de comportement requièrent des groupes de 20 animaux minimum. Cependant, pour réduire le nombre d'animaux, les mêmes groupes de souris seront utilisés pour plusieurs expérimentations. Par exemple, les mêmes souris seront utilisées pour plusieurs tests de comportement à plusieurs âges et ensuite utilisées pour les analyses biochimiques/immunohistochimiques. Pour ce projet nous utiliserons au maximum 1512 souris. Le bien-être animal sera respecté tout au long de chaque procédure. Au final, notre projet scientifique devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la MA et apporter des informations et des précautions importantes pour toutes stratégies thérapeutiques futures.

6289. En réanimation, le choc cardiogénique secondaire à un infarctus du myocarde est un problème majeur de par son taux de mortalité estimé autour de 60%. 7 à 10 % des infarctus du myocarde se compliquent d'un choc cardiogénique.

Un choc cardiogénique est lié à une défaillance aiguë primitive de la pompe cardiaque, entraînant des désordres hémodynamiques, métaboliques et viscéraux, en relation avec une chute du débit cardiaque et conduisant à un état d'hypoperfusion tissulaire. C'est l'une des causes de collapsus cardio-vasculaire. La première cause de choc cardiogénique reste l'infarctus du myocarde. La défaillance cardiaque va entraîner une vasoconstriction et une hypoperfusion tissulaire responsable de la défaillance d'organes multiples pouvant conduire au décès. Plusieurs hormones pourraient être impliquées dans ces phénomènes et notamment la vasopressine. Outre son rôle antidiurétique au niveau du rein la vasopressine induit également une vasoconstriction artérielle. Une corrélation négative entre la concentration plasmatique de vasopressine et l'index cardiaque chez des patients présentant une insuffisance cardiaque congestive a été observée. Plus l'index cardiaque est bas, plus la concentration plasmatique de vasopressine est élevée, suggérant que cette hormone pourrait jouer un rôle dans la survenue du choc cardiogénique.

Ce projet propose de caractériser le rôle de la vasopressine au cours du choc cardiogénique dans la phase précoce par l'analyse des marqueurs biologiques (vasopressine, copeptine), et des réponses vasculaires à cette hormone afin d'établir son implication et étudier les mécanismes sous-jacents. Nous utiliserons un modèle animal classique d'infarctus du myocarde. Une ligature chirurgicale de l'artère coronaire gauche sera effectuée chez des rats adultes. Cette ligature provoque une ischémie myocardique majeure qui devrait induire un choc cardiogénique secondaire. Ce modèle, parfaitement maîtrisé et en place depuis plusieurs années dans le laboratoire, a été choisi d'une part car différentes techniques sont opérationnelles pour évaluer la fonction cardiaque en particulier par échographie et d'autre part car les techniques chirurgicales sont facilement réalisables. De plus, dans ce modèle, les caractéristiques cliniques sont bien documentées et proches de celles de l'insuffisance cardiaque chez l'homme. Le choc cardiogénique se mettant en place rapidement après l'occlusion coronaire, les animaux seront sacrifiés le lendemain de la chirurgie pour les différentes études expérimentales.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de rats adultes (nombre estimé : 45 animaux sur 3 ans). Nous respecterons le principe des 3 R. Aujourd'hui, aucune alternative basée sur l'utilisation de méthodes *in vitro* ne peut mimer la pathologie (absence de connaissances de base des mécanismes impliqués). Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données. Nous réaliserons sur les mêmes animaux des investigations *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*. Pour certaines expérimentations chaque animal pourra être son propre contrôle (diminution du nombre d'animaux par groupe expérimental). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux et pour apprécier au mieux les points limites : plusieurs expérimentations réalisées sous la même anesthésie (échocardiographie, chirurgie), limitation du nombre de prélèvements sanguins, courte durée du protocole.

6290. L'obésité affecte environ 10% de la population mondiale et cause le syndrome métabolique. Les adipocytes sont caractérisés par une capacité unique d'expansion du volume cellulaire provoquée par l'accumulation de triglycérides avec une augmentation marquée de la rigidité cellulaire. Par conséquent, au sein des dépôts adipeux, les adipocytes hypertrophiés sont soumis à une contrainte mécanique qui est transmise aux cellules résidentes.

Nous postulons qu'une boucle de rétroaction mécanique positive agit dans le processus d'adipogenèse. Selon cette hypothèse, l'activation de voies mécano-sensibles spécifiques influence la différenciation des cellules précurseurs en adipocytes matures, avec une accumulation accrue de lipides. De plus, le stress mécanique des adipocytes hypertrophiés influence également la synthèse / sécrétion des adipokines, provoquant l'inflammation adipeuse. Ainsi, le stress mécanique au sein des tissus adipeux affecte significativement la structure et la fonction physiologique du tissu adipeux, représentant un facteur nouveau et important à considérer dans le contexte de l'obésité.

Nos résultats préliminaires indiquent que le canal ionique mécano-sensible Piezo1 est fortement exprimé dans le tissu adipeux, y compris les précurseurs et adipocytes matures. Nous allons étudier le rôle de Piezo1 dans la régulation de la croissance, de la synthèse/sécrétion des adipokines, ainsi que de l'inflammation adipeuse. Ces résultats fourniront de nouvelles informations sur la mécano-biologie du tissu adipeux et plus particulièrement permettront de définir le rôle de Piezo1 comme cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique associé. Nous avons conçu notre plan expérimental dans le souci de la règle des 3R :

- Remplacement : nous avons d'ores et déjà élucidé les mécanismes *in vitro* qui sous-tendent notre hypothèse. Nous avons besoin de les valider dans un organisme entier tel que la souris car pour le moment, aucun système *in vitro* ne nous permet de reproduire l'ensemble des mécanismes physiologiques d'un organisme entier. L'utilisation du modèle primate est très compliquée tant d'un point de vue éthique, financier et pratique. De par ses similarités avec la physiologie humaine et parce que le modèle d'invalidation de Piezo1 chez la souris est déjà établi, la souris constitue le meilleur modèle pour adresser nos questions dans une perspective préclinique.

- Réduire : nous avons effectué une large recherche bibliographique afin de nous assurer de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés. Cette recherche bibliographique nous a permis d'optimiser nos procédures et le nombre d'animaux à utiliser afin d'obtenir des résultats statistiques exploitables, robustes et valables. Pour mener à bien ce projet, il sera nécessaire de recourir à 600 souris.

- Raffinement : Le raffinement de notre projet s'effectue à partir de la naissance des souris et tout au long des procédures. Cela débute par la reproduction et le maintien des animaux dans une animalerie conventionnelle et agréée avec le personnel formé et habilité et le respect de la taille d'hébergement en fonction du nombre d'animaux. Des dispositifs d'enrichissement de milieu (un igloo et carrés d'ouate compressée) sont présents dans toutes les cages. Durant la phase expérimentale, le personnel technique habilité et formé, veillera à l'application des procédures visant à minimiser toute souffrance ou stress (notamment anesthésie/analgésie), réalisera les tests et notera toutes remarques pertinentes durant ou après la réalisation des tests expérimentaux sur des fiches de suivis (annexe1). Ces fiches incluent des grilles de scores avec des points limites précis, clairs et adaptés à nos expérimentations. La mort n'étant pas un point limite acceptable, nous sortirons les souris de l'étude lorsqu'un des points limites sera atteint et en cas de nécessité nous pratiquerons une d'urgence.

6291. L'objectif de ce projet est de caractériser et suivre les effets thérapeutiques de 5 peptides ciblant le lupus neuropsychiatrique en combinant des tests comportementaux et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) chez la souris *MRL/Lpr*.

Le lupus est d'une maladie auto-immune complexe et au diagnostic difficile. Inflammatoire, chronique, c'est une affection qui touche majoritairement les femmes et dont les symptômes et leur gravité varient beaucoup d'une personne à l'autre. Les atteintes peuvent être dermatologiques, rhumatologiques, rénales, mais également cérébrales (chez au moins 75% des patients). Cette



forme délicate de la maladie, encore très mal connue, constitue le lupus neuropsychiatrique ou neurolupus. Des anomalies structurelles au niveau cérébral sont observées chez les patients et pourraient être à l'origine des perturbations cognitives observées. Deux des 5 peptides de l'étude (P140 et 88-99 H4) ont déjà été testés dans ce modèle animal et l'un d'entre eux (P140) est en phase d'essai clinique avancé chez des patients lupiques. Les 3 derniers sont en cours de développement.

Nous désirons poursuivre ces recherches en complétant les études précédentes déjà réalisées sur ce modèle, pour comprendre l'action thérapeutique des peptides sur la structure/organisation et le fonctionnement du cerveau en alliant IRM et tests comportementaux.

Nous nous efforçons de respecter au mieux la règle des 3R.

-Remplacer : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif du travail est de visualiser les zones de ciblage et localisation cérébrales de peptides utilisés dans le traitement de cette pathologie.

-Réduire : nous n'utiliserons que 12 animaux par groupe, 12 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité interindividuelle. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure. Cette maladie étant évolutive, nous étudierons les effets des peptides à 2 âges différents des souris, à savoir 11 et 17 semaines. Chaque peptide sera testé sur les souris *MRL/Lpr* et leur contrôle *MRL+/+* ainsi que sur un groupe témoin de souris saines *BALB/c* à raison de 12 souris par groupe et à 2 âges différents. Un groupe composé de 5 *BALB/c* et de 5 *MRL* permettra de faire les optimisations d'IRM nécessaires pour cette étude.

Un total de 730 souris sur 5 ans sera utilisé pour ce projet.

Nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann et Whitney, adéquat pour les petits effectifs.

-Raffiner: Nous serons attentifs à enrichir l'environnement des animaux, et à former des groupes sociaux. Au cours des procédures, des moyens antalgiques seront mis en œuvre et des points limite seront appliqués.

6292. Le but de ce projet est d'assurer, conformément aux exigences de la réglementation sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la formation du personnel aux techniques pratiquées par le laboratoire de recherche, et d'assurer la formation continue qui permet de maintenir à niveau les compétences de chacun.

La formation est réalisée sous la responsabilité du responsable de formation qui s'assure du respect des recommandations internationales publiées et du respect du bien-être et du confort des animaux.

Les espèces concernées sont des rongeurs (souris, rats, cobayes) et des lapins : l'espèce utilisée et le type d'actes réalisés reflètent ceux qui sont effectués au cours de nos études. Le projet comporte 4 procédures : les 2 premières procédures correspondent aux administrations de substances et aux prélèvements chez les rongeurs et les lapins, la 3ème procédure correspond à une formation à la chirurgie sous anesthésie sans réveil, et la 4ème procédure correspond à une formation à la chirurgie en prévoyant le réveil des animaux. Sont incluses dans les 2 premières procédures les formations à l'anesthésie des animaux. Chaque technique est apprise séparément et un superviseur s'assure que chaque personne valide son apprentissage jusqu'à l'autonomie.

La démarche de remplacement est prévue en utilisant des documents et dans la mesure du possible des supports vidéos. Ce projet utilisant des animaux vivants reste nécessaire dans le but d'approfondir cette compétence technique et de former le personnel aux espèces et aux actes particuliers prévus dans les études en intégrant également l'étude des réactions et comportement des animaux.

Pour assurer la formation d'environ 50 personnes pour les rats/souris et d'environ 20 personnes pour les lapins/cobayes, ce projet utilisera au maximum par an : 160 souris, 500 rats, 50 lapins et 6 cobayes (soit au maximum sur 5 ans : 800 souris, 2500 rats, 250 lapins et 30 cobayes). Le nombre pour chaque espèce est ajusté au minimum nécessaire et tient compte des besoins d'acquérir une compétence technique validée, pour l'ensemble des techniques nécessaires, et à plusieurs âges des animaux. La démarche de réduction est prévue en optimisant le nombre d'animaux, tout en limitant cependant le nombre d'actes sur un même individu. Dans la mesure du possible, les animaux utilisés sont issus d'un projet précédent et non commandés seulement pour la formation. Cependant, il est possible dans certains cas, en vue d'un projet spécifique, que les animaux utilisés soient commandés pour la formation.

Dans un souci de raffinement, toutes les techniques seront enseignées selon des méthodes recommandées et visées par la Structure de Bien-Etre Animal, pour minimiser l'impact sur l'animal et avec une surveillance accrue des points limites. Les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum, et une anesthésie (normalement pas nécessaire pour des gestes peu invasifs) pourra être envisagée en début d'apprentissage.

L'hébergement est conforme aux recommandations en vigueur. Les animaux disposent d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de leur environnement. Notre standard est de socialiser les animaux sauf exceptions. En post-chirurgie, les animaux seront ou non socialisés selon le type d'intervention réalisée. De plus, pour éviter les bagarres, les souris mâles et les lapins matures sexuellement sont maintenus isolés. Enfin, les femelles gestantes sont également maintenues isolées. Dans ces cas d'isolement, les animaux restent en contact visuel, auditif et olfactif avec des congénères et ont accès à un enrichissement de l'environnement. Enfin, les techniques pouvant engendrer du stress seront limitées au minimum.

6293. Le fer, élément vital pour l'organisme, est apporté par l'alimentation. Il est indispensable non seulement au niveau cellulaire mais également au niveau systémique pour transporter l'oxygène vers les différents tissus. Si le fer vient à manquer, une anémie apparaît aboutissant à une oxygénation insuffisante des tissus. Inversement, la surcharge en fer peut induire des stress cellulaires (dû à ses propriétés réactives conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, communément appelées ROS). Les niveaux de fer doivent donc être finement régulés pour éviter toute toxicité ou tout déficit. Le rôle clé de 2 molécules

dans la régulation du métabolisme du fer a préalablement été montré. Ces molécules régulent notamment l'absorption du fer au niveau de l'intestin et jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire.

Le premier axe de ce projet consistera à définir les rôles physiologiques de ces molécules dans différents organes, impliqués dans l'homéostasie du fer. Dans un second axe, nous étudierons le rôle de ces molécules dans la mise en place de colites inflammatoires et d'inflammation systémique. Le diabète de type 2 étant associé à une inflammation chronique de bas grade, nous allons enfin examiner dans un troisième axe le rôle de ces molécules dans le développement de cette pathologie. Des expériences préalables *in vitro* ont été réalisées alliant des approches cellulaires et moléculaires afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Toutefois, l'immunométabolisme est complexe et fait intervenir de nombreux organes qui communiquent entre eux. Les molécules que nous étudions agissent simultanément sur différents tissus et leurs rôles ne peuvent donc pas être étudiés uniquement *in vitro*. Pour ce projet, nous utiliserons des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées. Le phénotype de ces souris génétiquement modifiées n'est pas dommageable.

Le nombre total de souris utilisé sur 5 ans sera de 780. Pour respecter le principe des 3R, un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais sera toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions.

Les souris seront soumises à des régimes pauvres ou riches en fer ainsi qu'à des régimes gras. Les modèles de colites et d'inflammation systémique seront induits chez les souris déficientes pour nos gènes d'intérêt dans l'intestin.

L'inflammation systémique sera réalisée sur une période de 7 heures afin de limiter de potentielles souffrances. Enfin, ces souris seront également soumises à des traitements antibiotiques pour évaluer l'importance du microbiote dans les différentes pathologies étudiées. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des points limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Ces études permettront à terme de définir ces molécules comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans les maladies liées à des dérégulations du métabolisme du fer (hémochromatose, beta-thalassémie, anémie...), de l'inflammation (colites) et dans le diabète de type 2.

6294. Dans les pathologies inflammatoires et infectieuses le fer joue un rôle primordial car il est à la fois pro-inflammatoire et un facteur de prolifération des bactéries.

Les objectifs de ce projet consistent en l'étude du rôle d'une molécule clé du métabolisme du fer dans les processus inflammatoires/infectieux chez la souris.

Des expériences préalables *in vitro* ont été réalisées, alliant des approches cellulaires et moléculaires, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Nous testerons le rôle de cette molécule clé du métabolisme du fer dans différentes procédures d'inflammation et d'infection.

Pour ce projet, nous utiliserons des souris WT et des souris déficientes pour notre gène d'intérêt dans différents tissus. Le nombre total de souris utilisé sur 5 ans sera de 544. 5 modèles d'inflammation et d'infection seront réalisés : cicatrisation, inflammation de la peau, infection bactérienne locale et systémique, blessure thermique. Pour respecter le principe des 3R, un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification).

De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des anesthésiques et antalgiques seront prévus pour éviter la souffrance des animaux. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale.

6295. La prévalence des pathologies métaboliques hépatiques, appelées aussi NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) pour maladies non-alcooliques du foie, est en augmentation constante depuis les dernières décennies au niveau mondial.

On estime actuellement qu'environ 20 à 30% de la population générale présente une NAFLD, et les études actuelles estiment que cette prévalence va encore augmenter dans les 10 ans qui viennent. Chez les obèses cette prévalence est de 80 à 90%, et elle est de 30 à 50% chez les diabétiques. Depuis 2011 l'augmentation épidémique des maladies métaboliques est considérée par l'Organisation des Nations Unies comme un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Il y a donc urgence à mieux comprendre ces pathologies au niveau moléculaire pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous nous intéressons au rôle des nutriments (tels que le glucose et les acides gras) et des hormones (telle que l'insuline), dans les dérégulations du métabolisme du foie qui conduisent à la NAFLD.

Les études seront réalisées sur des cultures primaires d'hépatocytes de souris. En effet, il n'est pas possible d'utiliser des lignées cellulaires établies car ce sont des cellules transformées en prolifération qui ont des caractéristiques métaboliques très différentes des hépatocytes *in situ*. De plus, les hépatocytes isolés à partir d'un seul animal seront utilisés pour tester plusieurs conditions expérimentales en parallèle, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le projet prévu sur 5 ans utilisera 510 souris.

L'isolement des hépatocytes entraînant la désagrégation du foie est une procédure létale. Lors de l'expérimentation, les animaux seront soumis à une anesthésie profonde et à des antalgiques pour empêcher toute souffrance. Afin de limiter au maximum la souffrance infligée, la procédure se déroulera sous une surveillance étroite de l'état des animaux.

A terme, ce projet qui vise à faire progresser la compréhension des dérégulations métaboliques à l'origine du développement des pathologies hépatiques de type NAFLD, permettra de proposer de nouvelles cibles moléculaires pour soigner ces maladies.

6296. La nature de l'alimentation influence fortement les qualités sensorielles et nutritionnelles des produits carnés de ruminants. Au-delà de ces critères de qualité, les consommateurs expriment des réticences face à l'intensification des conditions de production, et ils ont une image positive des systèmes herbagers à faibles intrants. Les recherches récentes montrent cependant un risque accru de défauts de qualité sensorielle de la viande et de parasitisme chez les agneaux produits dans les systèmes herbagers à faibles intrants. Les défauts de flaveur/odeur de la viande sont liés à une production accrue de légumineuses dans les prairies des systèmes d'élevage à faibles intrants.

Cette expérimentation a pour but d'étudier l'effet d'une complémentation avec des céréales (orge) au pâturage sur (i) les qualités sensorielles, notamment l'intensité des défauts de flaveur/odeur de la viande, (ii) les qualités nutritionnelles de la viande, notamment la composition en acides gras de la viande et du tissu adipeux et (iii) le niveau de parasitisme. Les données obtenues sur les animaux permettront aussi de compléter une base de données initiée il y a quelques années dans l'objectif de discriminer la viande d'agneaux d'herbe de celle d'agneaux engraisés en bergerie (authentification de l'origine herbagère de la viande).

Trois lots de 20 agneaux mâles de race Romane seront mis en expérimentation entre le sevrage (à environ 2 mois) et l'abattage (à environ 6 mois) : deux lots engraisés sur une prairie de luzerne, l'un recevant une complémentation en orge et l'autre non, et un lot engraisé en bergerie. L'hypothèse est que la complémentation en orge devrait réduire les défauts de flaveur/odeur, diminuer légèrement la valeur nutritionnelle de la viande et réduire le niveau de parasitisme. La luzerne sera offerte en quantité suffisante pour permettre de couvrir l'ingestion volontaire des animaux. Le régime offert en bergerie comprendra du concentré et du foin. Le foin sera offert à volonté. Le concentré sera apporté à un niveau permettant d'avoir un profil de croissance moyen similaire entre les agneaux engraisés en bergerie et les agneaux engraisés sur la prairie de luzerne (sans complémentation). On ménagera une transition alimentaire de 7 jours au sevrage (augmentation progressive du temps passé sur la prairie de luzerne) pour éviter le risque de météorisation. Une prise de sang sera réalisée au sevrage, en cours d'expérimentation et à la fin de celle-ci, pour analyser les concentrations en testostérone (hormone sexuelle interagissant avec le scatole).

Le principe des 3R (remplacement, réduction, raffinement) est respecté : (i) nous travaillons sur l'espèce cible (qu'il n'est donc pas possible de remplacer), (ii) notre approche statistique préalable nous permet de limiter le nombre d'animaux expérimentaux à trois lots de 20 animaux, et (iii) les animaliers en charge de l'expérimentation sur le terrain sont expérimentés et permettent un suivi du bien-être des animaux dans des procédures expérimentales peu contraignantes.

6297. Hippocrate, Avicenne et la médecine traditionnelle chinoise considéraient l'odeur comme une source de diagnostic et les changements d'odeurs comme le témoin d'une pathologie. Plusieurs travaux scientifiques récents ont confirmé que bon nombre de pathologies s'accompagnent en effet de modifications d'odeurs corporelles. Les cancers, seconde cause de décès à travers le monde et première cause de décès prématuré avant 65 ans en France, n'échappent pas à la règle. Si la littérature fait déjà état de cela, de nombreuses questions restent toutefois en suspens, tant sur les causes que sur les conséquences de ce phénomène, ainsi que sur sa possible utilisation pour la détection des cancers. A quel moment observe-t-on un changement d'odeur ? Les insectes vecteurs de pathologies telles que les moustiques détectent-ils ces modifications d'odeurs ? Ces changements modifient-ils leur préférence alimentaire ? Ces questions sont cruciales surtout lorsque l'on sait que l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prévoit une augmentation de l'incidence des cancers de 70 % dans les pays en voie de développement au cours des deux prochaines décennies et que les vecteurs de type moustiques abondent dans cette partie du monde. Ce projet vise donc à caractériser les changements d'odeurs survenant au cours de la tumorigenèse, et à étudier leurs éventuelles conséquences sur le comportement des moustiques.

Pour se faire, comme il est à ce jour impossible de mimer le comportement olfactif d'individus cancéreux, nous aurons recours au modèle animal de type murin. Nous utiliserons 120 souris de type de wild type et génétiquement modifiées qui lors de l'ajout de doxycycline dans leur alimentation développent un cancer. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous ferons une expérience pilote avec un nombre réduit d'animaux, par conséquent, nous ne travaillerons qu'avec un seul des sexes : des mâles. Pour le bien-être des individus, les cages d'hébergement présenteront des enrichissements et lors de la procédure d'évaluation du comportement des moustiques, de type anophèle, les souris seront protégées des piqûres par une moustiquaire.

6298. Ce projet concerne les traitements des troubles de l'humeur. Parmi les troubles de l'humeur, la dépression majeure touche plus de 300 millions de personnes dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la dépression deviendra d'ici 2020 la deuxième cause d'invalidité, après les troubles cardiovasculaires.

A l'heure actuelle, les traitements antidépresseurs n'ont un effet bénéfique que chez un tiers des patients. Ils sont sans effet chez de nombreux patients et certaines personnes sont incapables de supporter les lourds effets secondaires. De plus, l'efficacité des antidépresseurs actuels n'intervient qu'après quatre semaines de traitement. C'est pourquoi il est important et nécessaire de tester de nouvelles thérapies plus efficaces visant à soulager la dépression de façon plus rapide.

Comment tester le potentiel thérapeutique de molécules sur la dépression ? Cet effort préclinique nécessite des modèles reproduisant la condition neurologique ainsi que la réponse aux traitements existants et également un paramètre simple permettant d'identifier facilement l'action thérapeutique et se prêtant à un criblage pharmacologique. De tels modèles ne peuvent être obtenus que grâce aux études sur les animaux. Mais, lorsque cela est possible, par exemple pour toute l'analyse moléculaire, le modèle *in vivo* sera remplacé par des approches *in vitro*.

Ce projet vise à tester un grand nombre de molécules pour évaluer leur capacité à soulager la dépression. Il s'agit de molécules déjà présentes sur le marché pour le traitement d'autres pathologies.

Afin de tenir compte de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer), le nombre d'animaux sera réduit au minimum permettant d'observer des différences significatives lors des tests statistiques. 576 souris seront au maximum nécessaires. Le nombre d'animaux par lot est estimé sur la base des analyses statistiques à réaliser et du seuil de significativité qu'elles requièrent. Des groupes de 16 animaux permettront d'objectiver des différences significatives lors de l'utilisation de tests non paramétriques.

Les animaux sont hébergés en cage collective pendant toute la durée des expérimentations, dans le but de préserver les interactions sociales entre congénères. Les cages sont enrichies avec du matériel de nidation (frisure), avec eau et nourriture *ad libitum*.

6299. La stimulation cérébrale profonde est un traitement efficace des symptômes de la maladie de Parkinson. Elle consiste à continuellement stimuler électriquement des zones profondes du cerveau au moyen d'électrodes implantées. Malgré son succès, la lourdeur et la technicité de l'intervention chirurgicale nécessaire à l'implantation du dispositif, empêche sa diffusion à un plus grand nombre de patients. Une stimulation moins invasive, visant des zones corticales du patient plutôt que des zones plus profondes, permettrait de considérablement réduire la dangerosité de l'opération et de traiter un plus grand nombre de patients.

Des travaux récents ont montré qu'une telle stimulation corticale atténuait efficacement les symptômes moteurs et restaurait un fonctionnement sain des zones profondes du cerveau sur un modèle parkinsonien de singe. Cependant, des essais similaires sur des patients parkinsoniens se sont avérés infructueux. L'échec de cette translation thérapeutique à l'humain peut s'expliquer par deux facteurs. Le premier est que la stimulation corticale tend à induire des réponses à la fois excitatrices et inhibitrices dans les zones profondes du cerveau, dont les effets pourraient se compenser mutuellement. Le second tient à l'épaisseur du cortex humain : l'intensité de stimulation nécessaire pour induire une réponse thérapeutique est si élevée qu'elle engendre des comportements moteurs non désirés.

Ces deux obstacles pourraient être contournés en stimulant le cortex non plus avec de l'électricité, mais avec des impulsions lumineuses, et en adaptant en temps réel ce signal en fonction de mesures de l'activité cérébrale. L'optogénétique permet en effet d'induire une réponse ciblée (purement excitatrice ou purement inhibitrice) et le fait de stimuler en boucle fermée permet une stimulation bien plus parcimonieuse. Nous prévoyons également de tester cette stratégie de stimulation en boucle fermée par électrostimulation.

Nous proposons de tester cette stratégie sur un modèle rongeur présentant des symptômes parkinsoniens. Ces modèles animaux sont bien documentés dans l'étude de la maladie de Parkinson, et l'organisation des structures cérébrales impliquées est proche de l'humain. Si leur cortex cérébral est bien moins épais que celui de l'Homme, la preuve de concept visée par ce projet permettrait d'envisager une stimulation bien plus parcimonieuse (le signal de stimulation étant en boucle fermée), et à terme une atténuation des effets secondaires chez l'homme.

Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés dans cette étude (45) nous avons évalué, au préalable, les stratégies de stimulation sur des modèles mathématiques.

Les protocoles de chirurgies stéréotaxiques prévus (expression du modèle et implantation de canules intracérébrales de stimulation et d'enregistrement) ont été mis au point de façon à réduire au maximum la douleur (sous anesthésie générale et utilisation systématique d'analgésiques per et post-opératoires), et le stress induit par cette étude (suivi journalier par les zootechniciens et les expérimentateurs permettra de vérifier l'état des animaux au quotidien). En outre, le suivi du bien-être reposera sur la présence d'accessoires d'enrichissement de leur milieu de vie.

6300. 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 l'ovin et le caprin 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 de l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'animal est l'ovin/caprin jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclus 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.

La chronologie des études sera définie de manière à minimiser le nombre d'animaux à utiliser. Le nombre total d'animaux sur la durée du projet n'excèdera pas 600 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez l'ovin/caprin 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'UE (Union Européenne) 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 limite sont les suivants : toute altération du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, ou 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.

6301. Les porcs sont amenés à être traités avec des médicaments vétérinaires lorsqu'ils sont malades ou de manière préventive. Des textes officiels encadrent des études qui permettent de s'assurer de l'absence de résidus de ces produits vétérinaires 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 après calcul statistiques. Avant et possiblement après l'administration du médicament, des prises de sang seront réalisées afin de suivre la santé de l'animal et/ou la concentration du principe actif dans l'organisme. L'hébergement s'effectue dans des conditions normales d'hébergement de ces animaux. Les animaux seront généralement hébergés en collectif par box avec présence de copeaux et de paille au sol. Une évaluation quotidienne de l'état de santé général de l'animal sera réalisée pour une détection précoce de signes cliniques anormaux et une prise en charge rapide des animaux. Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress lié à la contention. Le but du projet est de tester 25 formulations chez les porcs. Le nombre d'animaux inclus pour tester chaque formulation est généralement 20 (4 animaux par temps d'abattage, 5 temps d'abattage). Le nombre total d'animaux prévu est donc de 500 sur une durée de projet de 5 ans.

6302. En Europe, les souris représentent près de 61% des animaux de laboratoire et les rats près de 14%. Les rongeurs sont les plus utilisés dans la recherche expérimentale étant un modèle présentant des caractéristiques proches de l'humain et une grande définition et stabilité génétique, ce qui en fait un modèle de choix pour les pathologies humaines. Leur forte utilisation est aussi du fait de leur petite taille (facilité de manipulation et de gestion), de leur courte durée de vie (étude courte) et d'une reproduction rapide et nombreuse (obtention de grandes quantités d'animaux). Ils représentent les modèles animaux dans les domaines tels que l'oncologie, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et métaboliques, l'immunologie, etc.

Ce projet a pour but d'avoir des rongeurs préparés pour nos clients en vue de leur utilisation dans leurs études expérimentales pour lesquels aucune méthode non-animale n'est disponible. Plusieurs prestations sont réalisées chaque année pour nos clients sur nos animaux (rats, souris, hamsters et gerbilles) : pose de cathéters (vasculaire : 400/an et non vasculaire : 400/an) ; chirurgie du système reproducteur (5500/an), du système urinaire (100/an), exérèse ou ligature partielle du système hépatique (100/an) ; chirurgie du système endocrine (500/an), splénectomie (200/an). Ainsi, au total pour notre projet qui va durer 5 ans, le nombre d'animaux prévus d'être utilisés et minimalisé est de 36000 rongeurs. Les animaux sont préparés selon la règle des 3R pour les principes de raffinement. Les animaux sont hébergés dans des conditions répondant à leurs besoins physiologiques, dans des cages contenant de l'enrichissement. Des moyens antalgiques seront mis en œuvre. Dans le cadre de l'observation des animaux, une surveillance spécifique constante est faite sur l'élaboration d'une grille de douleur liée à la chirurgie exercée sur l'animal. Des points limites sont définis pour chaque procédure chirurgicale à partir desquels une euthanasie sera opérée pour éviter toute souffrance à l'animal. Cette grille est élaborée en collaboration avec la structure chargée du bien-être animal. Elle fait l'objet d'une évaluation par le comité d'éthique dans le cadre de la demande d'autorisation de projet.

6303. Les vecteurs recombinants Adeno-associés ou rAAV sont des vecteurs de choix pour le traitement de maladies génétiques car ils assurent un transfert de transgènes thérapeutiques sûr et efficace dans différents tissus et organes tels que l'œil, le muscle, le foie ou le cerveau, permettant de traiter un large éventail de maladies. Cependant, même si le foie est un organe préférentiellement ciblé par certains sous-groupes de vecteurs rAAV, il est à ce jour nécessaire d'injecter de fortes quantités de vecteur chez l'Homme pour avoir une expression significative des transgènes. Pour diminuer la quantité de vecteur administrée afin de réduire à la fois la quantité de vecteur à produire et les réactions adverses, en particulier l'immunoréactivité vis-à-vis du vecteur, une modification des vecteurs a été réalisée. Ce projet vise à identifier chez le primate *Macaca fascicularis* un candidat utilisable à posteriori en clinique chez l'Homme pour réaliser un transfert de gène efficace dans le foie. Notre but ici est de réaliser une étude d'efficacité, et aussi d'évaluer des paramètres de toxicité liés à l'infusion de 3 vecteurs rAAV, dont le vecteur de référence rAAV8. Pour cela, nous allons réaliser une analyse comparative de l'expression du transgène délivré par les vecteurs, de leur bio-distribution dans l'organisme, des paramètres hématologiques et biochimiques d'intérêt, et des réponses immunitaires. Des études préalables *in vitro* ont été réalisées pour sélectionner les vecteurs à administrer chez les primates.

Le design expérimental de cette étude inclut 9 primates mâles (2-3 ans, 2.5 – 3.5 kg) et séronégatifs pour les vecteurs administrés.

Les animaux anesthésiés recevront une administration d'AAV par voie intraveineuse, selon les groupes suivants :

-Groupe 1 : 3 macaques qui recevront le vecteur 1

-Groupe 2 : 3 macaques qui recevront le vecteur 2

-Groupe 3 : 3 macaques qui recevront le vecteur 3

Le protocole d'administration par voie intraveineuse des rAAV a été validé lors d'une étude pilote portant sur 3 macaques fascicularis. Il sera repris à l'identique dans ce projet.

Les 9 animaux seront suivis durant 60+/-5 jours post injection, pendant lesquels ils auront tous les 15 jours des prélèvements sanguins sous anesthésie et ils seront euthanasiés pour prélèvements post mortem.

#### 1-Réduction

Nous avons réalisé des études expérimentales *in vitro* sur des hépatocytes humains et simiens pour 10 vecteurs rAAV potentiellement candidats, ce qui nous a permis d'effectuer une sélection préalable des vecteurs à administrer chez les primates. Nous avons sélectionné 2 vecteurs + le vecteur de référence, ce qui conduit à une réduction importante du nombre d'animaux à utiliser.

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

Afin d'interpréter les résultats de l'étude, un test statistique non paramétrique sera utilisé pour comparer les différents groupes.

#### 2- Raffinement

Des protocoles d'anesthésie seront mis en place selon la procédure.

L'administration expérimentale par injection intraveineuse se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux).

Les prélèvements sanguins réalisés au cours de l'étude, seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min).

Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces 2 procédures.

Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 quand possible (hors période de suivi post opératoire par ex.).

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du Centre. Le Centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, regroupant un certain nombre d'activités (qui sont suivies via un cahier d'enrichissement) : distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur, visionnage de films, mise à disposition de jouets, aménagement de l'habitat (miroirs et chaînes pour favoriser les déplacements verticaux...)

#### 3-Remplacement

Cette étude aura lieu chez le *Macaca fascicularis*. En effet, les études chez le primate apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes de toxicité, d'efficacité et d'immunogénicité de l'AAV. Ce qui permet d'extrapoler les résultats à l'homme. Ceci ne peut être obtenu *in vitro* et justifie notre recours à des animaux.

6304. Le schéma expérimental du projet que nous souhaitons mener comprend 2 phases, qui nous permettront de valider l'efficacité d'un même vecteur dans un même individu dans 2 domaines d'application thérapeutiques.

En thérapie génique, les études chez le singe apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes de toxicité, d'efficacité et d'immunogénicité des vecteurs utilisés (ici, bio inspirés). Ainsi, dans cette étude, le macaque fascicularis représente l'espèce animale de choix nous permettant de tester notre vecteur dans les mêmes conditions que chez l'homme (« full human dose ») dans un organisme proche de l'humain avant d'envisager un essai clinique. 3 macaques fascicularis au total seront inclus dans cette étude.

#### Phase 1 :

Dans le cadre de la thérapie génique, nous cherchons à optimiser la délivrance d'acides nucléiques codant des gènes d'intérêt thérapeutique à l'aide de vecteurs bio inspirés. Dans ce but, notre équipe a développé des formulations constituées d'un vecteur bio inspiré et d'acide nucléique (ARN messenger ou ADN) qui a fait ses preuves dans des modèles murins. Nous voudrions tester l'efficacité de nos formulations, d'une part avec de l'ARN, et d'autre part avec de l'ADN, sur des primates avant d'envisager un essai clinique chez l'homme. Afin de tester nos formulations, nous utiliserons chez le macaque une formulation développée et validée dans des modèles murins codant pour l'érythropoïétine (EPO). Après injection, l'efficacité de cette formulation permettant la production et la sécrétion d'EPO sera mesurable par un faible prélèvement sanguin. La sécrétion de la protéine aura pour effet physiologique une augmentation du taux d'hématocrite. Cet essai permettra de valider l'usage de nos formulations et plus particulièrement cette nanopshère codant pour l'EPO qui pourrait être un traitement novateur pour les patients anémiés. En effet, cette hormone est une cytokine pour les précurseurs des érythrocytes, dont la sécrétion entraîne une augmentation du nombre de globules rouges dans le sang qui sont essentiels pour le transport de l'oxygène dans le corps. Il existe actuellement une solution avec la protéine recombinante pour EPO mais celle-ci présente plusieurs inconvénients dont une demi-vie courte qui nécessite des injections répétées pouvant entraîner l'apparition d'anticorps neutralisant. Notre formulation validée sur des modèles murins sains ou anémiés nécessite des injections moins fréquentes avec des doses beaucoup plus faibles produisant la protéine naturelle. Afin de poursuivre notre recherche et d'envisager une étude chez l'homme, nous devons valider notre formulation sur le primate non humain. Chacune

des formulations sera injectée à 2 reprises et nous suivrons l'évolution du taux d'hématocrite des animaux par rapport à leur donnée pré injection. Selon les données préalablement obtenues chez le murin, nous devrions observer une évolution contrôlée et temporaire du taux d'hématocrite. Elle sera plus faible et plus courte avec l'ARN.

Phase 2 :

Cette phase porte sur l'immunothérapie et plus précisément l'immunisation contre un antigène cible. Nous menons actuellement un projet d'immunisation contre l'alpha foeto protéine (AFP) dans un modèle d'hépatocarcinome murin. L'immunisation de ce modèle contre l'AFP, antigène tumoral, permet une régression des tumeurs hépatiques. Avant d'envisager ce protocole d'immunothérapie chez l'homme, nous devons valider la capacité de notre formulation à induire une réponse humorale chez un gros animal proche de l'homme. Les macaques seront immunisés contre un épitope antigénique de protéines tumorale hAFP.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit :

- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit au strict minimum de 3, chaque animal étant son propre contrôle. Les mêmes animaux recevront les 2 formulations, puis suite à une période de « wash out » de 3 semaines les animaux recevront le protocole d'immunisation. Aucun test statistique ne sera réalisé.
- De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures de ce projet seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure.
- Un suivi régulier des animaux sera réalisé (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)
- Instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou euthanasie si pas d'autre alternative), avec fiche d'évaluation clinique post-injection des primates à distance.
- Les macaques seront en outre hébergés selon la réglementation en vigueur, par groupes de 2 ou 3 dans la mesure du possible (hors période de suivi post opératoire par exemple) afin de favoriser leurs échanges sociaux et favoriser leur bien-être.

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire.

La plateforme d'études précliniques, qui accueillera ce projet, dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, qui sont toujours hébergés au moins par deux quand cela est possible. Le programme d'enrichissement regroupe un certain nombre d'activités : distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur, visionnage de films, mise à disposition de jouets, aménagement de l'habitat (miroirs et de chaînes traversantes pour favoriser les déplacements verticaux).

6305. Les chiens sont régulièrement utilisés dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé humaine et animale. L'enjeu de ce projet est d'induire une boiterie chez le chien, puis d'administrer le produit d'intérêt médical et ensuite de vérifier l'efficacité du produit par rapport à la boiterie induite. Dans ce type d'étude, un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma) est également possible. Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire la réponse d'un être vivant, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier le produit. Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales dont induction de la boiterie, administration du produit, évaluation de la boiterie, prélèvements sanguins répétés, afin de suivre la pharmacodynamie et pharmacocinétique des produits administrés et prélèvements de liquide synovial. Seuls des chiens seront utilisés et chaque intervention sur l'articulation se fera sous anesthésie générale et le nombre de prélèvements (sang et synovie) sera toujours réduit au minimum. Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe (si possible). L'hébergement des animaux est conforme au plan d'hébergement et également conforme au programme d'enrichissement (présence de jouets dans les boxes...) Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...). Au total, au maximum 300 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

6306. Les plaquettes sanguines permettent l'arrêt du saignement lors d'une blessure et joue un rôle important dans le développement de maladies cardio-vasculaires (première cause de mortalité dans les pays industrialisés). Un moindre défaut de leur production ou de leur activation peut avoir des conséquences soit hémorragiques soit d'occlusion de vaisseaux amenant à des accidents vasculaires cérébraux ou des infarctus du myocarde. Ainsi, l'avancée des connaissances dans la biologie des plaquettes est indispensable.

La protéine Chk1 est essentielle au maintien de l'intégrité du génome en régulant la réplication, la transcription et la régulation de diverses étapes de la mitose. Rien n'est connu à ce jour concernant le rôle de Chk1 dans les plaquettes. Celle-ci doit avoir un rôle important car (i) la production de plaquettes fonctionnelles nécessite un système très contrôlé de réplication et de transcription et (ii) une étude récente montre une forte baisse du compte plaquettaire chez les souris délétées partiellement pour le gène Chk1 dont les causes sont méconnues à ce jour.

Ce projet vise à étudier le rôle de la protéine Chk1 dans la production et l'activation des plaquettes sanguines et de comprendre comment une délétion de la protéine Chk1 induit une forte baisse du compte plaquettaire. Pour cela, nous disposons d'un modèle de souris génétiquement modifié (knock-out (hétérozygote) de Chk1) qui présentent une délétion partielle de Chk1 dans l'animal entier. Le nombre de souris estimé pour cette étude sur 3 ans est de 96 animaux

maximum avec 4 procédures expérimentales. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum (i) en suivant des protocoles expérimentaux établis dans le laboratoire et en tenant compte d'expériences déjà réalisées qui nous ont montré que nous pouvons obtenir des résultats statistiquement corrects en faisant des groupes de 6 à 24 souris selon la procédure réalisée, (ii) en limitant aux seules expériences considérées comme absolument indispensables en fonction des résultats obtenus au cours du projet et (iii) en évitant la répétition d'études antérieures. Toutes les procédures expérimentales se feront sous anesthésie/analgesie. La douleur et souffrance des animaux sera évitée par une surveillance des animaux de la naissance à la mort et pendant toutes les procédures expérimentales, et une euthanasie rapide sera effectuée si l'animal est en souffrance. De la naissance à la mort, les souris sont hébergées selon les conditions de la directive européenne, régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R).

6307. Le traitement des douleurs chroniques par les médicaments analgésiques actuellement disponibles est décevant, particulièrement dans le cas des douleurs musculo-squelettiques (DMS) chroniques. La principale raison qui limite le développement de médicaments plus efficaces vient du manque de compréhension de la physiopathologie associée à ces douleurs. Dans ce contexte, notre projet propose d'étudier les mécanismes de chronicisation des DMS en utilisant 2 modèles animaux (240 souris: mdx et C57BL10, et 120 rats Wistar) appropriés, c'est-à-dire qui miment les DMS chez l'Homme. Sur ces modèles, nous réaliserons des expériences de comportement afin de quantifier la douleur chez les animaux, puis nous étudierons plus particulièrement le rôle des ASICs (Acid Sensing Ion Channels ou en français canaux ioniques sensibles à l'acidité). Les ASICs sont des canaux ioniques excitateurs présents à différents niveaux du neuraxe de la douleur, et qui ont récemment émergés comme de nouveaux acteurs importants dans différents type de douleurs. Cependant, les mécanismes par lesquels les ASICs sont impliqués dans ces différents types de douleur restent encore mal connus, et nous utiliserons des inhibiteurs pharmacologiques afin de démontrer le degré d'implication de ces canaux dans le développement et/ou le maintien des DMS chroniques. Ce projet permettra de mieux comprendre la physiopathologie des DMS, et il pourrait déboucher sur de nouvelles stratégies antidouleur associées à l'inhibition des canaux ASICs. Le remplacement des animaux n'est pas possible dans ce type d'étude puisqu'il s'agit de quantifier la douleur, phénomène propre à l'organisme intégré. La réduction du nombre d'animaux au strict minimum nécessaire est réalisée en réutilisant (quand les protocoles le permettent) certains des animaux pour plusieurs tests. Enfin le raffinement des méthodes d'étude est réalisé en veillant à ce que, lorsque le type de test le permet, l'animal en test puisse échapper à la douleur de lui-même (souvent cet échappement est d'ailleurs le paramètre mesuré).

6308. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. L'institut de veille sanitaire indique qu'en 2008, l'insuffisance cardiaque a causé 22 000 décès et 200 000 séjours hospitaliers en France. Les cardiomyopathies hypertrophiques d'origine génétique et non génétique présentent des pathologies qui, à long terme mènent à la mise en place et la progression de l'insuffisance cardiaque. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ce contexte sont encore mal pris en charge par les traitements actuels et nécessitent donc la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Cette situation clinique peut être étudiée au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. L'insuffisance cardiaque fonctionnelle induite par surcharge pressive du ventricule gauche consécutive à une sténose de l'aorte (c'est-à-dire une réduction de son diamètre et ainsi de son débit) est un processus intégré et complexe qui n'est à l'heure actuelle pas modélisable *in vitro*. De plus, les mesures des paramètres physiologiques, tels que la fonction cardiaque, la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les altérations de l'électrocardiogramme sont réalisables uniquement chez l'animal vivant.

L'objectif de ce projet est de poursuivre la mise en place dans notre laboratoire d'un modèle d'insuffisance cardiaque chez le rat induit par une sténose aortique (réduction importante du débit de l'aorte). La surcharge pressive exercée sur le ventricule gauche par la sténose va avoir pour conséquence directe une augmentation de son volume (hypertrophie) et va mener à long terme à la mise en place, via des processus physiopathologiques complexes, de l'insuffisance cardiaque.

La sténose aortique est réalisée par une intervention chirurgicale sous anesthésie générale. Le protocole d'analgésie (pré et/ou post-opératoire) le plus adapté sera déterminé lors des premières phases de chirurgie.

L'état général des rats est surveillé en post-opératoire d'une part pour s'assurer qu'ils ont bien récupéré leur état de santé (sutures, masse corporelle, activité locomotrice...), puis d'autre part tout au long de l'installation de l'insuffisance cardiaque afin d'identifier au plus tôt la survenue de ses symptômes caractéristiques (perte d'appétit, apathie, dyspnée). En cas de constatation d'un signe de souffrance, les animaux seront retirés de l'étude en fonction de points limites prédéfinis.

La dysfonction ventriculaire est mesurée au moyen d'imagerie clinique (échographie) en cours d'étude, ou de mesures hémodynamiques (pression intraventriculaire gauche, pression artérielle, fréquence cardiaque) sous anesthésie générale en fin d'étude. Des évaluations ex-vivo et in-vitro sont également réalisées en fin d'étude sur les organes/sang prélevés au moment de l'euthanasie de l'animal.



Ces différents types d'examen vont permettre dans un premier temps d'optimiser les conditions techniques de la chirurgie et de caractériser les atteintes cardiaques induites par la sténose aortique. Dans un second temps ils permettront de valider le modèle soumis à un traitement de référence, puis enfin de rechercher l'efficacité de candidats médicamenteux sur le modèle dans un troisième temps.

Dans cet objectif, les phases dédiées à la mise au point du modèle vont permettre d'affiner au plus juste le nombre d'animaux nécessaires statistiquement pour évaluer les effets de nos candidats médicamenteux.

Le suivi longitudinal de la fonction cardiaque par échocardiographie (technique non invasive et indolore qui peut être répétée au cours du temps sur un même animal) permet de réduire le nombre d'animaux par étude, sa réalisation sous anesthésie gazeuse (suivie du réveil) permet quant-à-elle de limiter le stress pour l'animal.

Les rats seront placés après la chirurgie en cages individuelles avec nourriture et eau à volonté, enrichies de bâtons de bois à ronger.

Ce projet prévoit l'utilisation de 1500 rats sur une durée totale de 5 ans.

6309. Le suivi des stocks et des populations de poissons est un élément important pour la conservation des espèces. Dans ce cadre, certaines unités de recherche capturent des individus dans le milieu naturel et les relâchent rapidement après quelques mesures, pour alimenter leur projet de recherche ou leur chronique de suivi à long terme.

La mission principale de notre unité est l'amélioration des connaissances sur le fonctionnement des populations de poissons en vue d'une gestion des populations adaptée aux enjeux sociétaux. L'originalité des approches réside dans la prise de considération de l'échelle individuelle dans la démarche, avec une attention particulière à l'expression des comportements et à l'état physiologique, ensuite intégrés dans des modèles populationnels. Les problématiques, les enjeux et les connaissances diffèrent selon les espèces.

Des missions de collecte de données à long terme nous sont confiées et nous utilisons pour cela des dispositifs ou des méthodes de capture qui permettent non seulement de capturer des poissons pour les projets de recherche que nous développons mais aussi d'alimenter nos chroniques de données et de tissus (écailles, morceaux de nageoires) qui, mis à la disposition de la communauté scientifique, permettent d'élaborer des programmes de suivis à long terme des populations de poissons diadromes (poissons vivants alternativement en eau douce et eau de mer) comme l'anguille, le saumon, la truite et l'aloise.

Les moyens mis en œuvre pour récupérer ces données sont :

- Des stations de contrôle (passes-pièges poissons) sur les cours d'eau que nous étudions. Ces dispositifs de capture sont implantés sur des barrages dont l'accessibilité a été rendue possible par la création de passes à poissons sur lesquelles nous implantons des chambres de captures qui permettent de stabuler les poissons avant qu'un opérateur ne relève le piège.

- Des pêches à l'électricité mises en œuvre pour capturer des poissons à des fins d'inventaire : ces pêches de capture et d'inventaire se déclinent sous trois formes : des indices d'abondance saumon et truite, des pêches de capture pour la réalisation de travaux pratiques pour des étudiants universitaires et enfin des pêches à des fins de capture de géniteurs de truites pour réaliser chaque année des tests de survie sous gravier.

Chaque année, nos équipes techniques interviennent sur deux stations de contrôle (passes à poissons). Le piégeage est assuré sur 10 mois de l'année entre février et décembre et les pièges sont contrôlés une à plusieurs fois par jour en fonction des conditions météorologiques. Sur ces passes pièges, plusieurs espèces de poissons sont susceptibles d'être capturées. Le suivi de trois d'entre elles nous intéresse particulièrement : le saumon atlantique dont les effectifs transitant par les pièges varient entre 50 à 400 individus, la truite sous ses deux écotypes (mer et rivière) dont les effectifs varient entre 100 à 300 individus. Enfin l'aloise dont les effectifs fluctuent plus aléatoirement entre 30 à 600 individus.

Pour chacun de ces poissons nous effectuons, après anesthésie dans un bain anesthésiant de benzocaïne à 30 mg/l, des prélèvements d'écailles pour déterminer l'âge, des prélèvements de tissu (petit morceau de nageoire pelvienne) pour acquérir l'ADN des individus et enfin un marquage pour identification si recapture avec un capteur : le pit tag. A l'issue de la prise de données (mesures biométriques) et des prises de tissus, les poissons sont réveillés dans une gouttière de réveil. Celle-ci est placée dans la rivière et les poissons, une fois réveillés, repartent quand ils le souhaitent.

Les pêches à l'électricité concernent majoritairement les truites et les saumons. Chaque année nous réalisons l'inventaire de 22 stations pour le saumon et 10 pour les truites. Au cours de ces opérations que nous réalisons au mois de septembre si les conditions météorologiques sont favorables, nous pouvons capturer à l'électricité entre 350 à 1000 tacons (jeunes saumons) et 80 à 200 truitelles. Comme pour les stations de contrôle, pour chacun de ces poissons nous effectuons après anesthésie dans un bain anesthésiant de benzocaïne à 30 mg/l, des prélèvements d'écailles pour déterminer l'âge, des prélèvements de tissu (petit morceau de nageoire pelvienne) pour acquérir l'ADN des individus et enfin un marquage pour identification si recapture avec un capteur : le « pit tag ». Enfin quelques géniteurs de truite (5 à 10) sont pêchés à l'électricité, leurs gamètes sont récupérées, puis ils sont relâchés. Les œufs fécondés sont insérés dans un dispositif expérimental qui teste la survie des œufs de truites jusqu'à l'éclosion dans des ruisseaux avec des paramètres contrastés. Au total, ce sont donc, au maximum, 2610 poissons que nous manipulons par an.

Dans la perspective du respect des 3 R, il est important de noter qu'il n'y a pas de sacrifice d'individus et que les protocoles d'échantillonnage et les modes opératoires permettent la réalisation des opérations de capture, marquage et prise de données, sans mortalité. La réduction du nombre d'animaux est réalisée via l'utilisation d'un échantillonnage par point (EPA) pour les pêches d'inventaire. Dans le cas des stations de contrôle nos captures tendent à être

exhaustives. Le remplacement n'est pas possible puisque nous étudions précisément ces espèces. Concernant le raffinement, des procédures sont en place pour diminuer au maximum le stress et la souffrance animale : nous veillons tout particulièrement aux protocoles d'anesthésie : les bains anesthésiant sont changés fréquemment (tous les 3 poissons pour les anadromes et tous les 30 poissons pour les juvéniles) et ce d'autant plus si la température est élevée. En cas de chaleur importante, les pêches à l'électricité sont décalées. Les contrôles sur les stations de piégeage sont quotidiens et matinaux, limitant ainsi le temps de présence dans la cage.

Il est important de préciser que les tissus prélevés (petit morceau de nageoire pelvienne et écailles) se régénèrent quelques semaines après le prélèvement.

6310. La vaccination demeure un outil majeur dans la protection des populations contre les infections virales. Les vaccins vivants atténués sont peu coûteux et confèrent une protection prolongée. Cependant, la plupart des souches vaccinales ont été obtenues par des méthodes empiriques qui ne permettent pas de contrôler finement le phénotype d'atténuation.

Ce projet propose de développer une approche générique pour la création de vaccins vivants atténués de nouvelle génération contre les virus à génome ARN du genre alphavirus, phlébovirus et flavivirus présentant un intérêt majeur en santé humaine car à l'origine d'une morbi-mortalité importante chaque année.

L'étude de l'atténuation virale rend par nature indispensable le recours à l'animal vivant. Aucune méthode alternative ne peut le remplacer. Cependant, et afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à ce projet, le phénotype des virus produits est d'abord étudié de manière poussée *in cellulo* ce qui permettra de réduire le nombre de souches virales testées.

Le modèle retenu pour ce projet est le rongeur. Nous travaillerons avec des lots de 6 animaux. Ce nombre a été ramené au minimum nécessaire pour assurer la validité des résultats. 29 souches virales atténuées seront testées chez la souris ou le hamster.

Afin de réduire encore le nombre d'animaux utilisés, une étude pilote sera réalisée pour chaque souche virale testée afin de stopper rapidement les expériences avec les virus qui n'auront pas les propriétés attendues. Les souches virales qui auront passé cette étape seront ensuite étudiées de façon plus poussée : étude de la protection induite par ces candidats vaccins (production d'anticorps et protection contre une infection ultérieure), stabilité du phénotype de ces souches.

Pour ce projet, nous estimons donc que nous serons amenés à travailler avec un maximum de 5028 souris et 1842 hamsters pour une période de 5 ans. Tout le nécessaire sera fait pour réduire le nombre d'animaux utilisés au cours de ce projet.

Les virus étudiés étant hautement pathogènes chez l'homme, les modèles utilisés induiront donc une infection sévère chez les rongeurs afin de reproduire au mieux la pathologie humaine que l'on souhaite prévenir. Cependant, nous serons vigilants en ce qui concerne les signes de maladie et d'inconfort des animaux testés et les animaux seront pris en charge par du personnel formé et expérimenté. De plus, l'administration de paracétamol et de buprénorphine a été prévue afin de réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Il est également important de noter, qu'à l'exception des groupes contrôles inévitables pour valider l'efficacité de nos candidats vaccins, peu (voire pas) d'animaux développeront une forme sévère d'infection du fait de l'étude poussée préalablement effectuée en cellule. Enfin, les administrations de virus et les prélèvements sanguins seront effectués au cours de l'expérience sur les animaux vivants anesthésiés.

Tous nos animaux sont hébergés en groupe en ISOcages, enrichies d'accessoires permettant aux animaux d'exprimer certains comportements naturels, participant ainsi à leur bien-être, dans un portoir ventilé sans transmission de vibration.

6311. Les cellules du système immunitaire qui circulent dans le sang se différencient toutes à partir de cellules souches dites hémato-poïétiques. Lors de ce processus de différenciation, les cellules se spécialisent progressivement dans la production d'un type cellulaire. Toutefois les étapes précises de la différenciation restent mal connues. En particulier, les connaissances actuelles proviennent d'expériences réalisées sur des populations de cellules. Or l'étude de la différenciation au niveau des cellules individuelles a déjà montré que les cellules souches et les progéniteurs ne sont pas identiques. Il apparaît donc important d'étudier la différenciation au niveau des cellules individuelles.

Comprendre les voies de différenciation des cellules individuelles, a de par le passé, conduit au développement de traitements pour stimuler ou réprimer le nombre de cellules immunitaires ou leurs fonctions, comme par exemple, l'identification de la molécule G-CSF pour stimuler la production de cellules immunitaires lors de chimiothérapie ou irradiation. Les modèles animaux comme la souris sont un outil indispensable pour étudier la complexité des voies de différenciation, ce qui ne peut être le cas avec des lignées cellulaires. A l'heure actuelle, il n'y a aucune méthode de remplacement possible.

Ce projet a pour but d'étudier le processus de différenciation hémato-poïétique au niveau de la cellule individuelle et d'évaluer l'impact de la localisation dans différents organes sur la différenciation des cellules immunitaires en situation homéostatique, inflammatoire et infectieuse. En effet les conditions inflammatoires peuvent perturber ces origines et les fonctions de ces cellules. Ainsi ce projet permettra de savoir si un type de cellules présentes dans différents organes sont produites par les mêmes voies et si dans le cas d'une augmentation de la production d'un type

cellulaire suite à une inflammation ou une infection, les mêmes cellules souches ou progéniteurs se divisent plus ou si d'autres cellules souches ou progéniteurs se mettent à contribuer.

Sur 5 ans, 1784 souris B6J seront utilisées, c'est le nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats tangibles, et les animaux subiront des dommages faibles. Pour cette étude, nous respectons la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de l'hématologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

6312. Le virus du Syndrome Dysgénique et Respiratoire Porcin (SDRP) est considéré comme un des virus avec le plus fort impact clinique et économique dans les élevages de porcs domestiques. Ce virus infecte de préférence les macrophages dans les poumons, où il se reproduit, diminuant la réponse immunitaire et rendant ainsi les animaux susceptibles à d'autres maladies respiratoires secondaires comme la grippe. Les macrophages sont des cellules immunitaires dont les rôles principaux sont l'élimination par phagocytose (processus permettant à une cellule d'englober puis de digérer une substance étrangère) des particules infectieuses ainsi que le contrôle de la réponse inflammatoire, d'où leur rôle essentiel dans la résolution des maladies respiratoires.

Selon leur origine et leur localisation, les macrophages auront des rôles opposés : ils vont soit favoriser soit lutter contre l'inflammation. Dans le poumon il existe les macrophages alvéolaires, situés dans la lumière des voies respiratoires. Ces cellules phagocytent les particules inspirées tout en maintenant les voies respiratoires dans un état anti-inflammatoire favorable à la fonction respiratoire. Chez le porc, il a anciennement été décrit l'existence d'un type de macrophage particulier, situé dans la paroi des vaisseaux sanguins du poumon profond nommé Macrophages Intravasculaires Pulmonaires ou PIM en anglais (pour Pulmonary Intravascular Macrophages). Ces cellules seraient spécialisées dans la phagocytose de particules transportées par le sang, comme des bactéries par exemple. Les PIM pourraient être infectés par le virus SDRP, et étant donné leur localisation vasculaire, pourraient-être les principales cellules responsables de la présence de virus dans le sang.

Ni l'origine, ni la fonction exercée dans l'inflammation par ces macrophages ne sont connues. Leur présence a été aussi démontrée chez l'Homme mais faute d'une caractérisation approfondie leur rôle reste inconnu. Afin d'être capable de les étudier de façon plus précise chez le porc mais aussi chez l'homme, il serait nécessaire de pouvoir isoler ces cellules *in vitro*. Pour cela, nous avons besoin de trouver un marqueur permettant de les distinguer des autres cellules du poumon et notamment des macrophages alvéolaires.

Nous nous proposons donc d'injecter dans le sang (dans la veine jugulaire) de porcs anesthésiés des bactéries inactivées marquées par un composé fluorescent (FITC). Les animaux seront euthanasiés 10 minutes après l'injection des bactéries et leurs poumons seront prélevés. Toutes les cellules seront extraites du poumon mais seules, les cellules phagocytaires en contact avec le sang (les PIM) auront internalisé des bactéries fluorescentes et seront donc elles-mêmes fluorescentes. Nous pourrions alors les identifier et les caractériser par différentes techniques. Être capable de détecter et de purifier les PIM nous permettrait de savoir si ces cellules sont infectées par le virus SDRP, et d'étudier en détail leurs fonctions, ce qui n'a jamais été fait dans aucune espèce.

Les animaux utilisés au nombre maximum de 10 seront des animaux réformés d'un autre projet, précédemment autorisé. Nous nous inscrirons donc dans le cadre d'une réduction des animaux en expérimentation animale. De précédents essais sur organes isolés n'ont donné aucun résultat (Remplacement), et le peu de connaissances actuelles sur ces cellules nous oblige à les prélever *in vivo* pour identification. (Raffinement) Les animaux sont hébergés en loge collective ou en couple pour la reproduction, des jouets sont mis à leur disposition (ballon, chaîne, « mordillo ») et la distribution d'épluchures de légumes et de fruits est effectuée.

6313. Notre projet a pour objectif la création de lignées génétiquement modifiées de poissons-zèbres qui seront ensuite utilisées pour comprendre comment sont régulés les mécanismes de réparation des chromosomes *in vivo*.

Les chromosomes, les molécules qui portent l'information génétique des cellules, sont essentiellement constitués de deux brins antiparallèles d'ADN (acide désoxyribonucléique), enroulés l'un autour de l'autre pour former une double hélice. Sous l'influence de différents facteurs physiques (lumière ultra-violette, radiation ionisante) et chimiques (dérivés réactifs de l'oxygène), les organismes vivants sont en permanence confrontés à des dommages de leurs chromosomes. Parmi ceux-ci, les cassures double-brin (CDB) de la molécule d'ADN sont particulièrement dangereuses car elles peuvent être à l'origine de mutations. Pourtant, on estime qu'une cellule est confrontée à une dizaine de CDB par jour. Chez les eucaryotes, organismes dont les cellules possèdent un noyau contrairement aux bactéries, différents mécanismes de réparation des CDB sont connus. Ces différents mécanismes permettent des réparations plus ou moins fidèle de l'ADN. Nous nous intéressons particulièrement à un mécanisme, dit ligature par micro-homologie (MMEJ, Micro homology Mediated End Joining), découvert relativement récemment. Ce mécanisme est une forte source d'erreur de réparation et son importance par rapport aux autres modes ainsi que sa régulation restent mal comprises. Ces différents mécanismes sont le plus souvent étudiés dans des modèles cellulaires *in vitro*. Néanmoins, ils peuvent être sous contrôle physiologique et présenter une variabilité importante au sein de l'organisme (contrôle développemental, contrôle tissulaire), questions qui ne peuvent pas être abordées dans les modèles *in vitro*. L'objectif de notre projet est de comprendre comment sont régulés les mécanismes de réparation de l'ADN *in vivo*, au cours du développement embryonnaire et pour cela, de suivre *in vivo* chez l'embryon de poisson-

zèbre les événements de réparation de l'ADN. Dans ce but, nous allons développer des lignées génétiquement modifiées portant des rapporteurs fluorescents dont l'activation dépend du mode de réparation d'une CDB induite artificiellement. Les animaux issus de ces lignées ne présenteront pas de phénotype mais, en les croisant entre eux, ils nous permettront d'obtenir des embryons chez qui nous pourrions induire des cassures de la molécule d'ADN et en suivre la réparation *in vivo*. En analysant la fluorescence dans ces embryons, nous pourrions déterminer quel type cellulaire favorise un mode de réparation ou un autre.

Notre projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R. Pour ce projet, nous utilisons le modèle poisson zèbre (*Danio rerio*). Cet animal est un formidable modèle pour l'étude du développement chez les vertèbres car il présente une somme unique d'avantages. En particulier, l'embryon est transparent et se développe à l'extérieur de la mère et il est possible de créer des animaux génétiquement modifiés par des techniques avancées d'ingénierie du génome. Ces avantages et la conservation des mécanismes qui contrôlent le développement embryonnaire des vertébrés, permettent au poisson-zèbre de remplacer avantageusement les modèles mammifères tels que la souris ou le rat. Dans le cadre de ce projet, sur cinq ans, nous allons créer 34 lignées génétiquement modifiées différentes. Pour cela, nous utiliserons des procédures qui permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés (3000 animaux en cinq ans). Enfin, pour assurer le bien-être des animaux utilisés, ces animaux font l'objet d'un suivi particulier tout au long de leur vie.

6314. Les maladies cardiovasculaires représentent plus de 31% de la mortalité mondiale avec 17,5 millions de décès par an dans le monde (« OMS, Maladies cardiovasculaires » 2016). Elles regroupent de nombreuses maladies telles que l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux ou les artériopathies oblitérantes des membres inférieurs et l'athérosclérose en est l'un des principaux facteurs de risque. L'OMS définit l'athérosclérose comme une "association variable de remaniements de l'intima des grosses et moyennes artères, consistant en une accumulation segmentaire de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de calcium, accompagné de modifications de la média" artérielle. L'athérosclérose se caractérise par l'accumulation de corps gras (cholestérol, triglycérides) dans l'espace sous endothéliale, au niveau des artères de conductance (artères de gros et moyen calibre comme l'aorte). C'est un processus inflammatoire mettant en jeu la modification des lipoprotéines de basse densité (LDL) en les oxydant (LDLox), les macrophages dérivés des monocytes et les éléments cellulaires de la paroi artérielle. Des études ont montré un rôle des mitochondries dans l'apparition de troubles cardiovasculaires. Les mitochondries sont importantes dans les cellules car elles produisent l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Or, les cellules cardiaques et vasculaires ont des gros besoins en énergie, notamment pour assurer leur fonction contractile. On peut donc supposer qu'une altération de ce système aura des répercussions au niveau cardiaque et vasculaire. La mitochondrie est un réseau tubulaire dynamique ayant un rôle essentiel dans la production d'énergie. Le mouvement du réseau de mitochondries ou « dynamique mitochondriale » permet à la cellule de s'adapter à son environnement. Il correspond à un équilibre entre la fusion et la fission des mitochondries avec des protéines impliquées dans la fission (Drp1) et dans la fusion (Opa1). Un lien entre la mitochondrie et les pathologies cardiovasculaires a été décrit sans que le rôle de la dynamique mitochondriale n'ait été étudié. Néanmoins des travaux récents suggèrent que la fission mitochondriale pourrait participer à la réactivité vasculaire.

Notre hypothèse est que la protéine de fission mitochondriale, Drp1, pourrait aussi avoir un rôle dans la formation de plaque d'athérome. En diminuant son expression de 50%, nous pourrions alors étudier si drp1 a un rôle, protecteur ou délétère, dans la formation des plaques athéromateuses. Notre hypothèse suggère qu'un défaut de fission de ces organelles aboutirait à un excès de stress oxydatif lequel est pro-athérogénique.

Nous utiliserons un lot de 480 souris, qui seront utilisées en premier lieu pour des études préliminaires afin d'évaluer le rôle de Drp1 dans l'athérosclérose, puis dans un second temps, nous étudierons, grâce à des prélèvements, les mécanismes impliqués. En accord avec la règle des 3 R, nous diminuons le nombre de souris au minimum nécessaire mais dans le but d'obtenir des résultats significatifs. De plus, le régime alimentaire des souris n'induit aucune douleur, et n'induit pas non plus l'obésité ou une maladie autre que l'athérosclérose. Il n'est cependant pas possible de remplacer le modèle animal dans cette expérimentation par une méthode alternative.

6315. L'obésité est liée à un déséquilibre entre apport nutritionnel et dépenses énergétiques. Ce déséquilibre entraîne de nombreuses complications dont le diabète de type 2 (DT2). Le tissu adipeux est considéré comme l'un des acteurs principaux des complications observées. En effet, le tissu adipeux des sujets obèses contient un grand nombre de cellules immunitaires à l'origine des complications métaboliques induisant entre autres le DT2. Parmi ces cellules immunitaires, les lymphocytes T de type 17 (Th17) sont retrouvés dans le tissu adipeux de sujets obèses, mais pas de sujets minces. Ces lymphocytes présentent la particularité de sécréter essentiellement des protéines dénommées IL-17A et/ou F qui induisent la sécrétion de molécule pro-inflammatoires par les cellules environnantes. Des travaux récents démontrent que les cellules souches adipocytaires (CSA) provenant du tissu adipeux des sujets obèses mais pas des sujets minces, induisent l'activation des lymphocytes Th17 au sein de ce tissu. Cet environnement inflammatoire est marqué par l'augmentation des protéines de l'inflammation dont l'IL-17A/F, le blocage de la production de cellules graisseuses (adipocytes) et rend les adipocytes insulino-résistants, une des caractéristiques du DT2. Sur la base de ces observations, il apparaît donc important d'évaluer l'effet du blocage de la production d'IL-17A/F dans la prévention de l'inflammation du tissu adipeux et de l'insulino-résistance chez le sujet obèse. Pour ce faire, nous utiliserons des souris qui n'ont pas de récepteur à l'IL17-A/F, les souris IL17RA KO (17RA<sup>-/-</sup>). Dans ce

modèle les souris seront soumises à un régime normo-calorique ou riche en lipides et en saccharose (HFHS pour High Fat High Sucrose). Ces travaux devraient donc permettre de clarifier si l'IL-17A/F est impliquée dans l'inflammation chronique du tissu adipeux, l'insulino-résistance, et/ou le DT2. Par ailleurs, la présence de polluants dans l'alimentation à doses faibles est connue pour provoquer des altérations métaboliques qui pourraient être en partie dues à une augmentation de l'inflammation au niveau du tissu adipeux. Nous étudierons donc en parallèle, l'impact des polluants sur l'inflammation du tissu adipeux et sur le métabolisme en utilisant soit des souris témoins, soit des souris IL-17RA KO. Pour tamponner les désordres métaboliques et inflammatoires liés aux polluants, notre objectif sera d'analyser l'effet des probiotiques, connus pour être anti-inflammatoires.

Afin de nous conformer à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction et Raffinement), le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. En raison de la nature complexe de nos recherches, qui visent à comprendre les réponses physiologiques au sein de différents organes, nous ne pouvons malheureusement pas remplacer l'utilisation de modèles murins par des outils cellulaires ou des approches *in vitro*. Signalons que les souris invalidées pour l'IL17RA sont connues pour ne pas présenter d'anomalies dommageables, ni de signes de souffrance. Néanmoins, nous avons mis en place une surveillance adaptée et individuelle des constantes métaboliques des animaux en cours d'expérience afin d'assurer leur suivi et l'obtention d'un maximum d'informations sur chacune des souris analysées. Cette approche devrait donc nous permettre de fortement réduire le nombre d'animaux utilisés, d'éviter leur souffrance et de limiter la répétition de nos expériences. Nous prévoyons l'utilisation d'un maximum de 490 souris sur une période de 5 ans. Cependant, dans le cas où aucune différence statistique n'aura été observée entre les groupes de souris « sauvages » et IL17RAKO supplémentées avec des polluants, 80 souris prévues pour les études "polluants et probiotiques" ne seront pas utilisées. En conclusion le nombre de souris demandé nous permettra de tester si le blocage du récepteur d'IL-17A/F présente un intérêt thérapeutique qui pourrait être proposé aux patients souffrant d'obésité et/ou DT2 associé.

6316. L'ostéochondrose (OC) est la forme la plus courante d'affection articulaire chez le jeune cheval : dans une étude réalisée en Normandie entre 2002 et 2004, 36% des poulains de 6 mois étaient affectés. Les lésions s'accompagnent le plus souvent de distension articulaire et parfois d'une boiterie ; les sujets affectés de lésions sévères ou multiples sont souvent inaptes à la course ou la compétition sportive. L'OC est d'origine multifactorielle, incluant des facteurs environnementaux et génétiques. Les lésions d'OC les plus précoces correspondent à une nécrose du cartilage épiphysaire qui empêche le processus d'ossification endochondrale. L'évènement causal en amont reste inconnu à ce jour. Ce projet propose de mettre en œuvre deux nouvelles technologies, l'analyse de microRNA (miRNA) et la métabolomique par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du liquide synovial pour progresser dans la compréhension des mécanismes conduisant à l'apparition d'OC. Les objectifs sont : 1) d'établir les profils miRNA et métabolomique moyen du jarret atteint d'OC en comparaison au jarret sain ; 2) d'étudier les potentiels facteurs de variation que sont la race et la gravité de la lésion d'OC. Dans un deuxième temps, l'annotation *in silico* des miRNA et des métabolites différenciellement présents chez les sujets atteints et les témoins devrait permettre de déterminer les métabolismes dérégulés lors d'OC, de cibler les dysfonctionnements et d'essayer de trouver des causes génétiques sous-jacentes. L'étude portera sur des chevaux affectés de lésions d'ostéochondrose du relief intermédiaire de la cochlée tibiale (OCD-1). Cette lésion très fréquente chez les chevaux français, se traduit presque toujours par une distension articulaire chez le jeune cheval et souvent par une gêne ou une boiterie à la mise au travail. Le traitement de choix est l'arthroscopie sous anesthésie générale. Du liquide synovial sera récupéré lors de la mise en place de l'aiguille dans l'articulation, préalable indispensable à l'introduction de l'arthroscope. Nous profiterons donc des cas spontanés présentés à la clinique équine pour récupérer des échantillons lors des interventions chirurgicales. La population de chevaux témoins sera constituée (i) de chevaux d'enseignement sur lesquels les prélèvements seront réalisés dans le cadre de la formation des vétérinaires ; (ii) de chevaux destinés à être euthanasiés pour des raisons autres qu'une affection de l'appareil locomoteur. L'objectif est de récupérer des prélèvements sur 100 individus affectés d'OCD-1 et 40 individus témoins. Ce travail ne peut se réaliser que sur des chevaux qui sont l'espèce cible de l'étude. Par ailleurs, plus de la moitié des miRNA sont spécifiques du cheval et n'existent pas chez la souris par exemple (remplacement impossible). Les procédures sont réalisées dans le cadre d'interventions cliniques normales et n'imposent aucune douleur supplémentaire aux animaux (raffinement). Les prélèvements réalisés sur des chevaux anesthésiés avant euthanasie permettent de réduire le nombre de sujets témoins.

6317. Le projet consiste à démontrer qu'un biomatériau composite biogénique organo-minéral d'origine marine présente des propriétés propres à faciliter la cicatrisation de tissus après lésion par brûlures.

Ce biomatériau provient du squelette externe (coquille) de mollusques bivalves, dont la matière, acellulaire, est composée d'une fraction minérale (>95%), essentiellement du Carbonate de calcium, et d'une fraction organique, elle-même constituée de protéines collagéniques et non-collagéniques.

Le biomatériau, obtenu par des traitements spécifiques brevetés, est totalement biocompatible, utilisable sous différentes formes selon les applications visées (poudre, pièces solides), et possède des propriétés de régénération cellulaire et tissulaire. Ces propriétés ont été décrites dans de très nombreuses publications.

Il s'agit ici, sur une application spécifique, le traitement de brûlures, d'observer le comportement du biomatériau, sa totale innocuité, et son efficacité par comparaison avec deux traitements actuellement utilisés sur les plaies de brûlures (vaseline officinale et préparation commerciale antiseptique).

L'expérimentation sera menée en deux phases impliquant au maximum 13 animaux:

Une première observation sur un nombre maximum de 3 animaux (porcs) sur lequel seront effectuées des brûlures de petite taille (8 par animal) de type second degré avec application en parallèle du traitement habituellement utilisé et du traitement évalué dans le présent projet, sous forme d'une crème obtenue à partir de la forme pulvérulente du biomatériau. Cette phase est destinée à la fois à vérifier le protocole générant les lésions nécessaires et suffisantes (application de masses chauffées à 95°C pendant quelques secondes sous anesthésie générale), à valider le protocole d'application des traitements topiques et à évaluer la variabilité et l'intensité des effets cicatrisants de notre traitement.

Nous estimons raisonnable de réaliser 4 paires de lésions symétriques sur le même animal.

Selon les résultats de cette observation, une expérimentation à but statistique démontrant les performances du biomatériau sera menée sur des groupes de 5 animaux (porcs). Cette phase est destinée à démontrer la non infériorité de notre traitement. Les recommandations normatives (ISO 10993) pour ce type d'essais nécessitent la comparaison de 20 traitements test et de 20 traitements de référence (soit 10 animaux au total). Dans le cas favorable où notre préparation démontrerait une efficacité supérieure au traitement de référence sur la base de la première phase, ce nombre devrait suffire à démontrer une significativité (pour des effets de l'ordre de 10% et un écart-type du même ordre).

Ce type de vérification de biocompatibilité et d'efficacité sur un tissu aussi complexe que la peau doit réglementairement être réalisé sur des modèles animaux avant tout essai clinique chez l'Homme. En réalisant plusieurs lésions sur le même animal nous réduisons le nombre total d'animaux impliqués, d'autant plus que nous pourrions travailler sur des échantillons appariés ce qui augmente la puissance de la comparaison réalisée. Enfin, nous réalisons une phase exploratoire afin d'ajuster les lésions à un niveau aussi peu impactant que possible pour l'animal (brûlures du second degré). Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne et des traitements antalgiques par voie générale leur seront administrés en fonction de l'aspect des plaies.

6318. La transplantation d'organe est le traitement de référence des défaillances chroniques terminales d'organe. Malgré le recours au traitement immunosuppresseur, l'exposition de l'organe transplanté au système immunitaire du receveur conduit à sa destruction par un mécanisme appelé le rejet d'allogreffe. Il existe 2 types de rejet : le rejet cellulaire secondaire à l'infiltration du greffon par les lymphocytes T cytotoxiques, et le rejet humoral impliquant la présence d'anticorps dirigés contre le donneur.

Le rejet d'allogreffe étant la première cause de perte des greffons dans le cas de la transplantation rénale, comprendre l'intégralité sa physiopathologie est un prérequis indispensable au développement de thérapeutiques ciblées qui permettrait de lutter contre ce dernier et donc d'allonger la durée de vie des greffons.

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont des cellules à la frontière de l'immunité innée et adaptative qui par les différents récepteurs présents à leur surface peuvent avoir un rôle au cours des 2 types de rejet d'allogreffe. Cependant, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  étant de découverte récente, leur rôle en transplantation d'organe solide n'a pas été étudié. Des travaux réalisés *in vitro* ont montré que ces lymphocytes peuvent jouer un rôle dans la physiopathologie du rejet de greffe. Cependant, les études *in vitro* ne peuvent refléter la complexité du système immunitaire nécessitant par conséquent la réalisation de travaux chez l'animal.

Des calculs d'effectifs nous ont permis d'établir le nombre minimal d'animaux par groupe pour que les résultats soient significatifs. Le bien-être des animaux sera analysé et pris en compte tout au long du protocole afin de minimiser son impact. Le nombre de souris nécessaire à l'ensemble des expériences : 340 Souris.

6319. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/3500 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X, à l'origine d'une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour.

En attendant la validation et mise en place de thérapies curatives visant à ré-exprimer la dystrophine, la thérapie pharmacologique est une des approches envisageables pour pallier aux processus physiopathologiques liés à l'absence de dystrophine.

Avant le passage chez l'homme, l'efficacité thérapeutique des approches expérimentales est aujourd'hui validée à l'aide de 2 modèles animaux de la DMD : la souris mdx et le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), tous deux porteurs d'une mutation dans leur gène de la dystrophine. Ces 2 modèles présentent cependant un certain nombre d'inconvénients :

- La souris mdx ne reproduit que partiellement les lésions tissulaires retrouvées chez les patients DMD et est relativement peu malade (espérance de vie équivalente à celle d'une souris saine).
- Le chien GRMD présente des lésions tissulaires proches et une évolution semblable à la maladie retrouvées chez les patients DMD, mais reste un modèle coûteux et lourd à manipuler. Enfin, l'établissement de cohortes statistiquement significatives est quasi impossible.

En 2014, un consortium de laboratoires, dont fait partie notre équipe, a généré un nouveau modèle animal de la DMD : le rat DMDmdx. Cette lignée de rat, qui a été caractérisée, se révèle être un très bon reflet de la pathologie humaine (atteintes supérieures à celles observées chez la souris mdx, comparables voire meilleures et plus reproductibles que celles observées chez le chien GRMD). Le rat, qui est 10x plus gros que la souris, reste malgré tout un modèle de petit animal de laboratoire bien connu et qui ne présente pas les limites du modèle canin. Ce modèle du rat DMDmdx peut donc se substituer au modèle canin, au moins pour réaliser les 1ères phases d'évaluation de l'efficacité de nouveaux produits thérapeutiques.

Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de produits pharmacologiques pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. Ainsi, sur ce modèle de rat DMDmdx, nous envisageons de tester 1 produit à une dose donnée.

Pour ce composé, des rats DMDmdx seront traités ou non pendant 8 semaines à partir de 4 semaines d'âge. Le traitement s'effectuera par voie orale via l'eau de boisson. Les animaux seront répartis en 2 groupes (traités et non traités) à raison de 10 animaux par groupe. Ce nombre est basé sur notre expérience en thérapie pharmacologique et permet d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles.

Un total de 20 animaux à inclure semble être un nombre minimal afin d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis puis un test de Dun's.

Un ensemble de paramètres sera évalué pour l'étude des effets de ce composé sur le comportement général et la fonction motrice des animaux : suivi du poids des animaux, de leur consommation alimentaire et hydrique. La force d'agrippement (Grip test), les capacités de déplacements horizontaux et verticaux (openfield) seront également analysés à 6 semaines et 12 semaines d'âge. Cette répétition de mesures non invasives permettra de suivre régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets des traitements sur chaque animal. Des prélèvements sanguins seront réalisés pour analyses hématologiques et biochimiques et préparation de sérums pour analyses des marqueurs circulants de la maladie.

L'approche *in vivo* sera complétée par des techniques *in vitro* d'analyse de la fonction musculaire en vue d'identifier les cibles d'action du composé. Pour cela, en fin de traitement les animaux seront euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés, et les propriétés contractiles de faisceaux cellulaires isolés de certains muscles seront analysés.

Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau préclinique les effets musculaires de ce composé d'intérêt sur le modèle de la DMD.

L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

#### 1- Remplacer

Ce projet d'analyse des effets bénéfiques potentiels d'un traitement pharmacologique chez le rat DMDmdx permettra de valider l'évaluation préclinique d'approches thérapeutiques de la DMD dans un modèle animal adapté. Ainsi, l'objectif est de réduire voire remplacer le chien GRMD pour cette évaluation préclinique.

#### 2- Réduire

Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en tenant compte de la validité statistique, des contraintes des modèles et des approches expérimentales.

Afin de générer ces 20 animaux, 15 mises à la reproduction seront nécessaires. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études, et en considérant que la lignée générera des portées de taille standard.

#### 3- Raffiner

- Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

- L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entraîner un déclin de l'état de santé (difficultés locomotrices, d'alimentation, voire respiratoires), l'état général des animaux sera surveillé de façon quotidienne par le personnel animalier pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Ces observations seront automatiquement fournies à un vétérinaire. Un tableau de points limites (cf. annexe 2) sera disponible.

- La mise en place de mesures adaptées en fonction des procédures expérimentales :

Les prélèvements sanguins à l'euthanasie seront réalisés sous anesthésie suite à une prémédication analgésique.

Les tests non invasifs d'évaluation de la force (Grip test) et de déplacement (Openfield) seront effectués sur animal vigile et ne nécessiteront aucun traitement d'emblée.

6320. Au cours du processus de transformation et tout au long de sa vie, la cellule cancéreuse produit des signaux qui sont précisément contrôlés dans les conditions normales. Certains de ces signaux dépendent d'interactions entre les protéines à l'intérieur de la cellule. Nous avons identifié des molécules qui bloquent les interactions d'une protéine clé avec ses partenaires, induisant ainsi la mort de la cellule cancéreuse. De façon très intéressante, les cellules traitées par ces molécules présentent des marqueurs permettant de prédire une activation du système immunitaire. Ceci est une observation très importante aux vues des récentes avancées en immunothérapie.

A ce stade nous avons montré l'efficacité d'une des molécules sur la croissance tumorale et voulons évaluer le bénéfice d'un traitement avec la molécule combinée à l'immunothérapie.

Nous allons respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer); Réduction : le nombre de souris sera réduit à minima pour permettre une analyse statistique, Raffinement : Lors de la réalisation des protocoles le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. Le modèle est bien connu et un suivi rigoureux

(3 fois/semaine) de l'état général des souris, permettra de détecter les points limites préalablement établis. Remplacement : des méthodes alternatives sont utilisées lorsqu'elles sont disponibles.

Le nombre de souris total pour les 3 procédures est : 300

6321. L'étude des mécanismes impliqués dans les maladies humaines et l'étude d'efficacité de nouvelles thérapies de ces maladies doit au final être évaluée sur les modèles animaux vivants.

Cependant, en raison de différences génétiques et biologiques entre les différentes espèces animales et les hommes, les résultats de ces études ne peuvent pas être toujours transposés à l'homme.

En raison d'absence de modèles prédictifs de l'action des médicaments sur l'homme, le développement de nombreux médicaments s'arrête en phase clinique.

L'utilisation des espèces plus élevées et plus proches de l'homme, telles que les primates non-humains, doit être évitée. Depuis longtemps, les chercheurs tentent de modifier les animaux modèles tels que les rongeurs pour les rendre biologiquement plus proches de l'homme. Le développement des rongeurs fortement immunodéficients, donc plus réceptifs aux cellules humaines, a permis de perfectionner ces modèles.

Notre société, considérée comme précurseur dans le domaine des animaux humanisés, est devenue le leader mondial et un prestataire de services reconnu dans la recherche préclinique.

L'objectif de notre projet de recherche est donc de développer de nouveaux modèles de rongeurs chez lesquels certaines populations cellulaires, telles que les cellules du système immunitaire ou les hépatocytes, seront remplacées par celles de l'homme provenant soit d'un patient soit d'un donneur sain. De plus, ces animaux pourront être greffés avec des cellules pathologiques telles que les cellules tumorales, cibles de thérapies.

Par la suite, nous allons évaluer sur ces animaux l'efficacité des thérapies avec des composés développés par nos clients ou par la branche recherche de notre société.

Pour réaliser ce travail de recherche et ces prestations de service, nous prévoyons d'utiliser sur 5 ans : 25000 souris immunodéficientes et 2500 rats porteurs de différentes modifications génétiques les rendant plus permissives à la survie et au développement des différentes populations cellulaires humaines.

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

6322. Les hydrogels ont été étudiés de manière intensive pour développer des applications biomédicales et l'ingénierie tissulaire en raison de leur biocompatibilité et de leurs similitudes avec les tissus vivants et la matrice extracellulaire. Créer des hydrogels biocompatibles, capables d'adhérer à des surfaces biologiques et de libérer des nutriments ou des facteurs de croissance et de prolifération cellulaire, représente un challenge majeur, à l'interface entre la chimie, la biologie, et la médecine. Le but du projet est de tester l'hydrogel *in-vivo* sur des modèles animaux de pathologies gastro-intestinales (GI) mécaniques et métaboliques. Les matériaux proposés sont constitués d'un réseau chimique organique mou réticulé biocompatible, et de nanoparticules de silices mésoporeux afin d'en augmenter l'élasticité et d'ajouter une fonction supplémentaire, la libération de composants actifs. Nous avons également développé les conteneurs inorganiques pour qu'ils soient détruits en quelques jours et éliminés après la réalisation de leurs effets. La destruction des systèmes poreux en petits fragments et leur élimination seront étudiées lors des expériences *in vivo*. Les hydrogels conçus sont dotés d'importantes propriétés liées à : i) leur réalisation facile, qui n'exige pas de catalyseur ou de chaleur ; ii) leur adaptabilité mécanique et leur élasticité; iii) leur transformation rapide de la forme sol. En gel, qui peut être contrôlée à la demande en la faisant varier de quelques minutes à quelques heures. Ces squelettes, une fois implantés, devraient éviter ou réduire la réponse immunitaire pour obtenir la guérison souhaitée du tissu. L'adhésivité de l'hydrogel hybride sera produite par l'introduction, dans la structure du gel, de fonctions adhésives bio-inspirées et elle sera modulée pour s'adapter aux différents environnements, mécanique (anatomie et physiologie) et chimique de du tractus gastro-intestinal. Les gels seront testés *in-vitro* avec différents types de lignées cellulaires pour vérifier leur biocompatibilité et ils seront ensuite injectés sous forme liquide durant les expériences *in vivo* en utilisant des techniques endoscopiques. Nous avons l'intention d'utiliser les matériaux développés comme agents de remplissage ou d'imperméabilisation afin de restaurer, guérir et traiter des maladies mécaniques, fonctionnelles et métaboliques du tractus gastro-intestinal.

Ce projet a pour but d'explorer l'utilisation de l'hydrogel par injection ou application sur une surface afin de :

- 1) tonifier le sphincter œsophagien inférieur dans le but de restaurer la barrière anti-reflux affaiblie dans la maladie de reflux gastro-œsophagien (RGO) ;
- 2) traiter les fistules digestives grâce à une occlusion mécanique du trajet fistuleux ;



3) créer un film chimique protecteur de surface, imperméable aux aliments et permettant de court-circuiter des segments de l'intestin responsables de la résistance à l'insuline (IR), chez les patients obèses avec un diabète de type 2.

4) utiliser l'hydrogel comme solution liftante et véhicule des molécules actives pour améliorer la pratique des dissections sous muqueuses (ESD) dans le traitement des cancers digestifs superficiels. L'hydrogel permet une élévation rapide, stable, persistante et sélective de la muqueuse et la génération d'un coussin de fluide plus important qu'avec une injection d'une solution standard.

Sur base de nos travaux préliminaires, nous proposons des stratégies thérapeutiques ciblées et innovantes pour le traitement des pathologies gastro-intestinales, mécaniques et métaboliques communes, qui seront appliquées par des méthodes peu invasives, ciblées, conservatrices et personnalisées et impacteront significativement les coûts des soins de santé.

Remplacement :

Le recours à l'animal est nécessaire pour évaluer l'efficacité du traitement de l'hydrogel pour les différents traitements proposés ci-dessus, afin de pouvoir envisager par la suite la mise en place d'essai clinique chez l'homme.

La régénération tissulaire ne peut se faire *in vitro* ou sur pièce cadavérique, et nécessite le recours à l'animal vivant.

Réduction :

Cette étude a été conçue pour nécessiter un minimum absolu d'essai *in vivo* permettant d'obtenir des résultats exploitables. Dans ce but lorsque ça sera possible, le traitement control et le traitement test seront réalisés en parallèle sur le même cochon permettant d'en diminuer le nombre. D'autre part lorsque le protocole le permet plusieurs procédures seront réalisées sur un animal permettant de diminuer le nombre d'animaux tout en ayant des résultats statistiquement exploitables.

Le nombre d'animaux est de 68 cochons (24 large white, 20 Yucatan et 24 Gottingen) a été calculé comme il suit :

a) pour la procédure incluant la création de fistules digestives en raison de 2 fistules par cochon et un suivi de 6 semaines, 8 cochons (Yucatán / cochons chinois) seront nécessaires.

b) pour l'ESD pour le traitement du cancer superficiel digestif 20 cochons large white seront nécessaires et distribués ainsi : ESD œsophagienne (9 animaux), gastrique (6 animaux) et colique (5 animaux) avec une survie de 4 semaines. Dans le cas de l'estomac et du colon, la structure de l'organe permet de réaliser 4 procédures par animal (2 avec hydrogel et 2 contrôles).

c) Pour une première preuve de concept de l'application du gel pour le traitement du RGO (sans survie) 2 cochons large white seront nécessaires. En cas de succès, s'en suivra la réalisation de la procédure sur 12 cochons (Yucatan) dont 6 traités avec hydrogels, 3 avec injection de solution physiologique et 3 contrôles avec une période de survie de 4 semaines.

d) Afin de déterminer la faisabilité technique de la procédure (projection d'hydrogel dans le duodénum) pour le traitement du diabète de type 2 par la réalisation d'une imperméabilisation gastrique chimique, 2 cochons large white sont nécessaires (sans survie). En cas de succès, s'en suivra la réalisation de la procédure sur 24 cochons (Gottingen) avec une survie de 6 mois.

Raffinement :

Le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Toutefois, les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs, des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés.

6323. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une structure épitopique conformationnelle. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et représente donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui stimule la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Des échantillons de sang de l'animal sont prélevés pour évaluer la réponse immunitaire et le niveau de production d'anticorps. Lorsque le titre est suffisamment élevé, l'antisérum est préparé à partir d'une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (un organisme intégré est nécessaire pour réaliser une réponse immunitaire non reproductible à ce jour in vitro, sachant que l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps est adaptée selon les cas), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole pour répondre à l'objectif scientifique), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile, définir des points limite appropriés).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles pour un besoin correspondant à de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocoles et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 lapins.

La période minimum d'immunisation est de 21 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

6324. Le vieillissement de la population engendre une constante augmentation du nombre de patients atteints de maladies neurodégénératives chroniques, telle que la maladie de Parkinson. Ce domaine médical souffre actuellement d'un manque de thérapeutiques capables de ralentir le développement de la maladie. Ce projet est destiné à mettre en œuvre un modèle animal mimant certains événements mis en jeu dans cette pathologie, afin d'évaluer dans le futur les traitements médicamenteux innovants issus de la recherche et d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés lors des essais cliniques.

Ce modèle est développé chez la souris. Les souris sont couramment utilisées dans le domaine des maladies neurodégénératives, et en particulier la maladie de Parkinson. Cette espèce présente l'avantage de fournir des souches stables et bien caractérisées ce qui permet une bonne reproductibilité des modèles et donc une optimisation du nombre d'animaux à inclure dans les études. De plus, la souris est l'espèce la plus couramment utilisée pour le développement d'animaux transgéniques. Ce modèle murin fait appel à une modification génétique visant à reproduire une diminution de l'expression d'un gène détectée dans le cerveau de patient Parkinsonien. Le but est d'induire un développement progressif des phénomènes de déficits moteurs et de neurodégénérescence afin de s'approcher au plus près du décours temporel de la pathologie.

Notre établissement s'attache à réduire au maximum l'usage des animaux dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Ainsi ce modèle inclut à la fois des tests comportementaux, répétés à différents âges chez le même animal, et des mesures de paramètres biochimiques et histologiques. Cela permet d'évaluer différents paramètres en parallèle, réduisant ainsi le nombre d'études et permettant de corréliser ces différents marqueurs cliniques et biologiques. Ces informations sont indispensables pour la mise en œuvre des futurs essais cliniques de façon pertinente et sûre. Le cerveau est constitué de plusieurs types cellulaires différents qui interagissent pour la mise en œuvre des processus physiologiques mais aussi neurodégénératifs. Il présente de plus la particularité d'avoir une grande capacité de plasticité et d'être très dépendant de sa vascularisation. Cette dynamique du fonctionnement physiopathologique du cerveau et sa traduction en capacités motrices, mnésiques et associatives ainsi que le lien avec des biomarqueurs centraux et périphériques ne peuvent être évalué que par les études chez l'animal. Un support du service des

biostatistiques est apporté aux expérimentateurs pour l'élaboration du design expérimental, optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études et effectuer ou revoir les analyses statistiques.

Nous nous attachons à améliorer les conditions des études en optimisant les conditions d'hébergement (en particulier par l'enrichissement adapté aux besoins des souris), Les phénomènes de neurodégénérescence centrale ne produisent pas par eux-mêmes de phénomènes douloureux. Pour l'ensemble des procédures des points limites généraux et spécifiques sont identifiés. Cela permet au personnel en charge des expérimentations et des soins aux animaux (formé à l'observation des signes cliniques) d'identifier rapidement toute manifestation inattendue et de prendre les mesures nécessaires dans l'intérêt de l'animal.

Ces études sont conçues et mises en œuvre par des personnels experts scientifiques formés spécifiquement à l'observation des animaux, et en lien constant avec les personnels de soins aux animaux, et les vétérinaires de l'établissement. Ces procédures sont discutées et approuvées par le comité d'éthique avant leur mise en œuvre, et celle-ci se fait en lien avec la structure chargée du bien-être de l'animal, afin de permettre une amélioration constante des conditions de recours à l'animal.

Le nombre maximal d'animaux utilisé dans le cadre de ces modèles est estimé à 2000 souris pour la durée du projet (5ans).

6325. Notre laboratoire a un rôle dans la surveillance des émergences épizootiques ou et des micro-organismes à risque d'émergence, en particulier sur les infections à virus comme le virus de la maladie hémorragique des cervidés (EHD), nous cherchons à assurer une surveillance optimale de ces infections virales chez les espèces sensibles, par l'amélioration des outils diagnostiques. Cette activité diagnostique nécessite la constitution de banque de sérums caractérisés et repose sur la production de sérums animaux dirigés contre ces virus. Ainsi, les sérums polyclonaux obtenus après immunisation d'espèce sensibles (ruminants) avec des virus vivants produits sur des cultures de cellules (lignées) serviront comme outil de diagnostic (Séronéutralisation et vironeutralisation) ainsi qu'au développement et à la validation d'outils sérologiques (développement de tests ELISA par exemple). Les ruminants sont utilisés pour la production de ces sérums car ils permettent d'obtenir des grands volumes de sérums de référence et ils constituent les espèces les plus sensibles pour les infections à Orbivirus tels que le virus de l'EHD. L'antigène est un surnageant de culture de cellules eucaryotes ou procaryotes infectées, et sera administré 2 fois (sans adjuvant) afin de permettre la production d'un sérum polyclonal de bonne qualité (titres élevés d'anticorps neutralisant) et en quantité satisfaisante. L'inoculation d'orbivirus vivant doit être effectuée en confinement A3, car il induit une virémie chez l'animal infecté et le virus peut alors être transmis à un autre animal sensible par le biais de Culicoides, moucheron vecteurs de ces virus, naturellement présents sur le tout le territoire français. La virémie induite par un virus vivant provoque une réponse humorale importante, notamment des titres élevés en anticorps neutralisant, par comparaison à une réponse humorale induite avec un virus inactivé.

La production de ce type de sérum ne peut être réalisée autrement qu'en utilisant des animaux vivants. Elle est nettement plus efficace lorsque réalisée dans une espèce sensible (qui autorise la multiplication virale). Nous envisageons de produire des sérums dirigés contre 7 variants du virus de l'EHD. Chaque variant sera inoculé à un seul veau car nous estimons que la production de sérum sera largement suffisante pour nos besoins. Ce nombre de 7 veaux ne peut pas être réduit. L'infection des bovins par le virus de l'EHD est décrite comme provoquant peu de signes cliniques, toutefois les animaux bénéficieront d'une surveillance quotidienne, des traitements antalgiques seront mis en place si leur état le justifie et les animaux seront euthanasiés dans le cas peu probable où leur état se dégraderait de manière importante.

6326. Avec un nombre de cas diagnostiqués qui ne cesse d'augmenter, les cancers représentent un problème majeur de santé publique. Le rôle du système immunitaire dans la répression de la croissance tumorale est aujourd'hui admis, comme en témoigne le succès des récentes immunothérapies qui augmentent l'action anti-tumorale du système immunitaire. Cependant l'immunothérapie se heurte à l'action immunosuppressive de deux acteurs majeurs et complémentaires que sont le Transforming Growth(TGF)-bêta et les lymphocytes T régulateurs (Treg). Le TGF-bêta favorise la croissance tumorale de manière directe mais aussi en diminuant l'activation du système immunitaire contre la tumeur. Les Treg répriment également l'action des autres acteurs du système immunitaire et favorisent ainsi la croissance tumorale. Si le TGF-bêta est décrit comme essentiel à la différenciation des Treg, son rôle sur les Treg différenciés et ses conséquences sur la croissance tumorale sont inconnus. Par ailleurs, le TGF-bêta doit être activé pour se lier à son récepteur. Cette activation se fait par l'action de l'intégrine (Itg) av $\beta$ 8 (Itg $\beta$ 8), entre autres, fortement exprimée par les Treg contrairement aux autres lymphocytes T. Les conséquences sur la croissance tumorale de cette capacité unique des Treg à fournir une source active de TGF-bêta est inconnue.

L'objectif de ce projet est, dans une première partie, de comprendre le rôle du récepteur au TGF-bêta sur les Treg différenciés dans le développement d'adénomes. En effet, des résultats préliminaires ont permis de montrer que l'absence du signal du TGF-bêta sur les Treg déjà différenciés induit le développement spontané d'adénomes gastro-intestinaux. Dans la deuxième partie du projet, le but est de comprendre l'importance de l'activation du TGF-bêta par les Treg via l'Itg $\beta$ 8 sur la tumorigénèse dans le cadre de cancers induits. Ce projet implique une analyse à l'échelle de l'organisme entier. Seule l'espèce *Mus musculus*, mammifère de petite taille, dont le système immunitaire est très bien caractérisé et proche de celui de l'Homme, et pour lequel des lignées cancéreuses existent, permettra de répondre aux

questions biologiques posées dans des conditions physiopathologiques adéquates. Des groupes de 3 à 7 animaux adultes, d'âge et de sexes similaires, par expériences, seront réalisés. L'observation des animaux sera réalisée tous les deux jours par les expérimentateurs et permettra un suivi précis des points limites et de limiter toute souffrance animale. Aucun animal ne sera isolé et le milieu des cages ventilées sera enrichi selon les règles de l'établissement hébergeur. Des points limites précoces permettront d'éviter tout signe de douleur ou de stress majeurs. Le nombre d'animaux sera réduit à son strict minimum, en veillant à une interprétation statistique correcte des résultats. Les perspectives offertes par ce projet sont riches tant au niveau de la recherche fondamentale, décrivant les premiers mécanismes reliant le TGF- $\beta$  et les Treg dans la croissance tumorale qu'au niveau de la recherche appliquée en ouvrant la voie vers l'utilisation de neutralisants du TGF- $\beta$  en thérapies anti-cancéreuses. Pour ce projet, 348 souris seront impliquées sur une durée totale de 5 ans (48 pour le maintien de la lignée et 300 pour l'expérimentation).

6327. Les lagomorphes sont régulièrement utilisés dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible) et humaine. Ils sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale, médicament humain ou vétérinaire) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible).

Dans ce type d'étude, un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les urines, détection dans les tissus) ou/et un suivi des modifications hématologiques, biochimiques et ou enzymatiques est également possible.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales : la procédure d'administration du produit à tester, la procédure de prélèvements sanguins répétés. De plus, des prélèvements d'urine, de différents tissus ou organes seront parfois nécessaires. Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe ou de façon individuelle (s'il y a que des lapins mâles, pour un suivi de consommation d'aliment ou d'eau, pour des recueils d'urine...par exemple) dans des cages comprenant du matériel d'enrichissement adapté (ex: tablette cachette, buchette à ronger...) et en ayant un contact visuel avec ses congénères. Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...).

Au total, au maximum 500 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

6328. Le projet évalue les effets anticancéreux d'un traitement combinant thérapie ciblée et chimiothérapie sur un modèle de tumeur du foie chez le lapin. La thérapie ciblée consiste à injecter un gène qui sensibilise la tumeur à la chimiothérapie. Ce gène est vectorisé dans des cellules souches de lapins qui sont elles-mêmes injectées au plus près de la tumeur par un cathéter placé dans les artères qui l'irriguent. Quelques jours après avoir injecté les cellules contenant le gène, on réalise la chimiothérapie par voie intraveineuse.

Des essais sur des souris ont montré une disparition complète de tumeurs sous-cutanées après 4 cycles de traitement. Les cellules souches étaient injectées à l'intérieur de la tumeur et la chimiothérapie dans la cavité abdominale.

L'équipe de recherche souhaite maintenant évaluer l'efficacité de ce traitement pour des tumeurs du foie. La procédure de traitement doit être le plus proche possible des conditions d'administration qui seraient utilisées chez l'homme pour ce type de cancer, c'est-à-dire en injectant les cellules souches localement par voie vasculaire et l'agent anticancéreux par voie intraveineuse. Les rongeurs n'ont pas une taille suffisante pour effectuer ces procédures. Il existe un modèle de tumeur du foie chez lapin. La taille du lapin permet d'utiliser les mêmes matériels d'anesthésie, de chirurgie et d'injection que chez l'homme.

Le projet comporte deux étapes. La première étape évaluera la dose de chimiothérapie qui peut être administrée aux lapins sans effets secondaires toxiques majeurs. Comme chez l'homme, on utilisera un antidote pour diminuer au maximum les effets toxiques sur l'animal. Trois doses de chimiothérapie seront testées. L'injection sera effectuée deux fois, à une semaine d'intervalle comme dans la seconde étape.

La seconde étape évaluera l'efficacité de la thérapie ciblée combinée à la chimiothérapie. Des tumeurs seront implantées dans le foie par voie chirurgicale, deux semaines avant le début du traitement. L'injection des cellules contenant le gène sensibilisateur sera effectuée par une méthode mini-invasive, à travers un cathéter placé dans l'artère hépatique sous contrôle radioscopique et sous anesthésie générale. Deux jours après, l'agent anticancéreux et l'antidote seront administrés par voie intraveineuse aux animaux vigiles à la dose déterminée dans la première étape. Les deux traitements seront répétés une semaine après la première séance. On comparera 3 groupes de traitement : 1) la thérapie ciblée seule, 2) la chimiothérapie seule, 3) la thérapie ciblée + la chimiothérapie. La taille de la tumeur sera suivie toutes les semaines par échographie. Des prises de sang hebdomadaires et le monitoring journalier de l'état général des animaux permettront de suivre la tolérance du traitement. Deux semaines après la première injection, les animaux seront euthanasiés et les tumeurs prélevées pour analyse des effets du traitement.

Le nombre total d'animaux utilisé pour le projet est de 29 lapins.

Respect des 3R :

Remplacement : des essais *in vitro* ont été réalisés pour tester la toxicité et l'efficacité des produits et mélanges de produits. L'utilisation d'animaux vivants est maintenant nécessaire pour évaluer la réponse au traitement dans les conditions pratiques cliniques : conditions d'anesthésie, anatomie et physiologie, matériel utilisé, biologie tumorale.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé est estimé d'après l'expérience de notre établissement sur le nombre d'individus nécessaires pour réaliser une analyse statistique pertinente. Les groupes contrôle incluent moins d'animaux et il n'y a pas de groupe 'placebo' sans traitement, dont les données seront reprises d'études antérieures.

Raffinement : des mesures préventives contre la douleur sont utilisées: un traitement avec un antidote est utilisé pour limiter les effets secondaires de l'anticancéreux; des méthodes d'anesthésie générale gazeuse et analgésiques par des morphiniques sont systématiquement employées pendant et après les procédures susceptibles d'induire une souffrance. Pendant l'étude, un suivi quotidien des animaux est mis en place avec une évaluation quantitative de la douleur; la cause de la douleur est recherchée par des examens vétérinaires et sanguins afin de définir le moyen qui permettra de la réduire.

6329. Dans le cadre du diagnostic, de la prévention et du traitement des maladies humaines et animales, la recherche de nouveaux médicaments apportant une meilleure sécurité d'emploi, une efficacité accrue ou tout autre avantage thérapeutique reste essentielle. Compte tenu de la complexité des organismes visés par cette recherche, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative fiable au recours à l'animal. Dans un souci de protection de la santé publique, la loi exige que l'innocuité des candidats médicaments soit évaluée lors d'études précliniques chez une espèce de rongeur et une espèce non-rongeur. Ces études doivent en outre être conduites en respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) qui garantissent leur qualité et intégrité. Elles sont à ce titre l'objet d'inspections réglementaires spécifiques et sont destinées à être soumises à différentes autorités réglementaires à diverses étapes du développement de médicament.

Ce projet couvre les études réglementaires de toxicologie et préliminaires ou investigatrices associées ainsi que les études de toxicocinétique réalisées chez le chien dans le cadre défini ci-dessus. Des études d'efficacité, de pharmacologie, de pharmacocinétique, d'interaction entre médicaments ou à des visées plus mécanistiques (biomarqueurs) permettant de comprendre ou prédire les effets toxiques, et de sélection de candidats médicaments/doses, sont aussi couvertes par cette demande, de même que les études visant à l'acquisition/maintien des compétences techniques, le développement des techniques/méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 1500 sur une période de 5 ans (une soixantaine d'études).

L'objectif de cette autorisation de projet est de définir les procédures opératoires mises en œuvre chez le chien dans le cadre des études précliniques de toxicologie générale/toxicocinétique pour les candidats médicaments humains et vétérinaires en vue de soumissions réglementaires internationales incluant les INDA (Investigational New Drug Applications), les CSA (Clinical Study Applications), les NDA (New Drug Applications), les WMA (World Wildlife Marketing Applications) et IB (Investigational Brochures). Ces études sont exigées par les réglementations nationales (par exemple en France l'Arrêté du 9 septembre 1996 NOR:TASP9624370A) et précisées dans les lignes directrices internationales (OCDE, ICH, ...).

La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales (OCDE, ICH, VICH...) afin d'obtenir les résultats les plus fiables et scientifiquement pertinents tout en garantissant les plus hauts standards en matière de qualité, bien-être animal, et d'éthique (remplacement, réduction, et raffinement). A ce titre, celles-ci requièrent :

- des chiens des 2 sexes, dont l'âge et poids peuvent varier.
- le nombre minimal d'animaux est dicté par les lignes directrices réglementaires internationales (OCDE notamment).
- une durée (de un jour à environ 12 mois, éventuellement suivis d'une période de récupération/réversibilité),
- et des procédures (administration du candidat médicament, observations et examens réguliers, suivi médical individuel, et examens terminaux).

Pour les études « non réglementaires », les critères ci-dessus peuvent être modulés (ex : nombre de chiens plus faible, un sexe seulement) dans la mesure où les objectifs diffèrent.

Les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant les dommages pour les animaux ; de fait, la plupart des animaux des premières études, réalisées sur la base d'informations très limitées, auront des effets légers à modérés, et un très faible nombre d'entre eux pourra avoir des effets substantiels. Dans les études suivantes, ceux-ci ne devraient avoir pas d'effets ou seulement avoir des effets légers à modérés. Des effets sporadiques, généralement légers et transitoires, peuvent aussi être observés du fait des propriétés pharmacologiques du candidat médicament.

Une attention particulière est apportée aux exigences de remplacement, réduction et raffinement tout au long des études, depuis leur conception jusqu'aux données présentées aux agences afin de conduire les essais cliniques chez l'homme. En particulier, le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes sont définis par les lignes directrices internationales, les chiens sont hébergés en groupes stables d'animaux compatibles avec des enrichissements sociaux (interaction avec les congénères, interaction avec l'homme), des enrichissements de l'environnement et des récompenses alimentaires, et l'inconfort et le stress sont limités au maximum (habituation des chiens à certaines

procédures, méthode du clicker training, état de santé des animaux contrôlé quotidiennement, intervention du vétérinaire dès que nécessaire).

6330. Dans le cadre du diagnostic, de la prévention et du traitement des maladies humaines et animales, la recherche de nouveaux médicaments apportant une meilleure sécurité d'emploi, une efficacité accrue ou tout autre avantage thérapeutique reste essentielle. Compte tenu de la complexité des organismes visés par cette recherche, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative fiable au recours à l'animal. Dans un souci de protection de la santé publique, la loi exige que l'innocuité des candidats médicaments soit évaluée lors d'études précliniques chez une espèce de rongeur et une espèce non-rongeur. Ces études doivent en outre être conduites en respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) qui garantissent leur qualité et intégrité. Elles sont à ce titre l'objet d'inspections réglementaires spécifiques et sont destinées à être soumises à différentes autorités réglementaires à diverses étapes du développement de médicament.

Ce projet couvre les études réglementaires de toxicologie et de toxicocinétique telles que définies ci-dessus et réalisées chez le rat. Des études d'efficacité, de pharmacologie, d'interaction entre médicaments ou à des visées plus mécanistiques (biomarqueurs) permettant de comprendre et prédire les effets toxiques, et de sélection des candidats médicaments/doses, sont aussi couvertes par cette demande. De même que l'utilisation de rats dans des études visant l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou de méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques. Certaines de ces études peuvent en outre viser de raffiner et de réduire le recours à l'animal, voire de le remplacer dans l'avenir. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 15000 sur une période de 5 ans (une centaine d'études).

La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales (OCDE, ICH, VICH...) afin d'obtenir les résultats les plus fiables et scientifiquement pertinents tout en garantissant les plus hauts standards en matière de qualité, bien-être animal, et d'éthique (remplacement, réduction, et raffinement). A ce titre, celles-ci requièrent :

- des rats des 2 sexes, d'environ 5 à 10 semaines d'âge (et donc d'un poids approximatif entre 75 et 500 g)
- un nombre minimal d'animaux [10 à 26 animaux/sexe/groupe et 4 groupes, soit en général 80 à 208, ou pour des besoins spécifiques justifiés et des études chroniques, jusqu'à 800 (60 rats par sexe/groupe et jusqu'à 6 groupes, dont 3 contrôles, et 80 animaux pour la toxicocinétique)],
- une durée (de un jour à deux ans),
- et des procédures (administration du candidat médicament, observations et examens réguliers, suivi médical individuel, et examens terminaux).

Pour les études « non réglementaires », les critères ci-dessus peuvent être modulés (ex : nombre de rats plus faible, un sexe seulement) dans la mesure où les objectifs diffèrent.

Les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant les dommages pour les animaux ; de fait, la plupart des animaux des premières études, réalisées sur la base d'informations très limitées, auront des effets légers à modérés, et un très faible nombre d'entre eux pourra avoir des effets substantiels. Dans les études suivantes, ceux-ci ne devraient avoir pas d'effets ou seulement avoir des effets légers à modérés. Des effets sporadiques, généralement légers et transitoires, peuvent aussi être observés du fait des propriétés pharmacologiques du candidat médicament.

Une attention particulière est apportée aux exigences de remplacement, réduction et raffinement tout au long des études, depuis leur conception jusqu'aux données présentées aux agences afin de conduire les essais cliniques chez l'homme.

6331. L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité thérapeutique de composés chimiques ou biologiques dans un modèle reproduisant une pathologie humaine de fibrose pulmonaire.

La fibrose est la conséquence de l'activation chronique des fibroblastes et myofibroblastes, cellules situées dans le tissu conjonctif de différents organes, qui se mettent à produire en permanence du tissu cicatriciel (dépôts de collagène, élastine, fibronectine).

Dans les poumons, l'apparition de ce tissu cicatriciel s'accompagne ou est précédée d'une phase inflammatoire. La fibrose pulmonaire se caractérise par une perte de l'élasticité du poumon et l'apparition d'une insuffisance respiratoire chronique chez le patient (toux, essoufflement, fatigue, cyanose...). Il n'existe pas à ce jour un médicament permettant d'éliminer la fibrose pulmonaire, les traitements disponibles ralentissent uniquement la progression de la maladie sans réduire les signes cliniques comme la toux, l'essoufflement et l'insuffisance respiratoire.

La bléomycine (agent anti-cancéreux utilisé chez l'homme) est connue pour se concentrer dans les poumons, avec comme effet secondaire délétère le développement chez le patient d'une fibrose pulmonaire. Chez le rongeur, lorsqu'elle est instillée par voie intratrachéale sous anesthésie générale, la bléomycine induit une fibrose pulmonaire semblable à celle observée chez l'homme. Une seule administration de Bléomycine déclenche l'apparition d'une fibrose atteignant son maximum en 2 à 3 semaines, pour se résoudre ensuite spontanément 6 à 8 semaines après l'exposition. Les signes cliniques attendus chez les animaux sont modérés : une faible perte de poids transitoire

consécutives à l'inflammation pulmonaire après l'administration de la Bléomycine, et une possible réduction de l'activité lorsque la capacité respiratoire est altérée par la fibrose.

Ce projet reproduira chez le rongeur la pathologie pulmonaire fibrotique telle qu'elle est observée chez l'homme, et permettra l'évaluation de composés anti-fibrotiques. L'efficacité des composés testés sera déterminée par la mesure de marqueurs circulants et pulmonaires (TGF $\beta$ , dépôts de collagène, hydroxyproline...). Les composés chimiques ou biologiques qui seront évalués dans ce projet auront au préalable été sélectionnés sur des critères de puissance et d'efficacité *in vitro*. En fonction de leurs propriétés pharmacocinétiques, ils pourront être testés en mode préventif ou thérapeutique par exemple par voie orale, intrapéritonéale ou sous-cutanée.

Une analyse statistique des résultats obtenus lors de l'étude pilote nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaire par groupe dans les études pour obtenir un effet significatif de 50% sur les marqueurs pertinents (poids des poumons, taux d'hydroxyproline, dépôts de collagène).

Des points limite seront définis et s'ils sont atteints, les animaux seront euthanasiés afin d'éviter toute souffrance importante.

Pour une période de 5 ans, on peut estimer une utilisation de 500 rongeurs/an soit au maximum 2500 animaux au total pour ce projet.

6332. Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie.

Les épidémies de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie.

La flambée d'Ebola qui a débuté en 2014, qui a nécessité la déclaration de l'état d'urgence internationale par l'OMS, a été responsable de plus de 28000 cas dont 11000 décès. Cette épidémie sans précédent a montré comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre).

Il est urgent de développer des vaccins pré/post-exposition efficaces.

Nous proposons à travers ce projet une approche vaccinale visant à booster le système immunitaire notamment sur les phases défaillantes lors de l'infection au virus Ebola. Cette approche est composée de deux principes : l'utilisation d'anticorps couplés à un antigène entraînant une réponse immunitaire cellulaire et l'utilisation d'un vecteur modifié couplé à un antigène boostant une réponse humorale.

La capacité du vaccin à stimuler des réponses immunes protectrices chez les animaux sera testée en prophylaxie avant infection dans un autre établissement utilisateur (demande de projet distincte).

Il sera effectué dans notre établissement la partie challenge virale et le suivi.

Le but de ce projet est d'étudier la capacité des animaux vaccinés à contrôler l'infection.

Ce projet, composé d'une procédure, nécessite l'utilisation de 15 macaques cynomolgus. Des groupes de 4 animaux (3 pour le groupe contrôle) sont mis en place traités soit par le vecteur soit par les anticorps, soit par un anticorps de contrôle (non spécifique) soit par un tampon phosphate.

Conformité avec les 3R :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables afin d'explorer la meilleure approche pour observer l'action protectrice des anticorps et du vaccin.

Le macaque est le seul modèle animal sensible à l'infection par la souche sauvage du virus Ebola. Dans le cadre de ce projet, l'utilisation des macaques est indispensable à la bonne réalisation des procédures expérimentales.

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, l'enrichissement de confort et sur l'enrichissement de stimulation (altères, anneaux, sachets surprises). Le bien-être animal sera suivi à l'aide d'un « scoring » éprouvé qui reprend les observations du comportement, de la prise alimentaire et hydrique, des symptômes hémorragiques. Les animaux seront visités quotidiennement et observés par un personnel avisé et qualifié. Un examen clinique sera effectué à chaque anesthésie. Le temps de travail en animalerie A4 étant réglementée, la vidéosurveillance permet également de revoir le comportement des animaux pendant les périodes où ils ne sont pas stimulés par la présence des techniciens.

6333. Dans le cadre de la commercialisation de vaccins destinés aux chevaux, un contrôle d'innocuité est imposé par la réglementation.

Les tests sont réalisés sur les chevaux.

Pour chaque lot de vaccin, 2 chevaux reçoivent chacun une double ou une triple dose vaccinale. Ils sont observés quotidiennement durant 14 ou 28 jours suivant cette vaccination. Une grille de notation des effets indésirables (état général, fièvre et inflammation au point d'injection) est renseignée. Ce test est déterminant pour la commercialisation du lot.

Les résultats attendus de ce projet sont de contribuer au contrôle de lots de produits afin de s'assurer leur fiabilité et de leur conformité par rapport aux spécifications et aux textes de référence en vigueur avant leur mise à disposition pour répondre au besoin du marché.

Le degré de sévérité des protocoles de ce projet est léger pour l'ensemble des animaux.

Animaux concernés :

50 chevaux pour la durée du projet (5 ans). A la fin du projet l'ensemble des chevaux sont réutilisés ou replacés en tant que chevaux de loisir.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Le contrôle des lots en vue de leur commercialisation fait appel à des techniques *in vitro* complétées par ce test d'innocuité. Le test d'innocuité n'est plus exigé par la pharmacopée européenne, Pour les pays ne faisant pas partie de l'Europe et où le vaccin est distribué, la demande de suppression est en cours. Ce test d'innocuité reste malgré tout obligatoire pour les pays où la réglementation l'impose et où nous exportons nos produits.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisé est décrit dans les textes réglementaires. Seuls 2 chevaux sont nécessaires à chaque test. D'autre part, compte tenu du très faible impact de chaque test, les animaux peuvent être réutilisés jusqu'à l'âge de 10 ans.

Raffinement :

Les chevaux sont hébergés en groupe et observés quotidiennement. En cas de problème de santé, un vétérinaire effectue le suivi clinique et prescrit un traitement. Les tests sont réalisés sur animaux en parfaite santé.

6334. Ce projet a pour objectif d'être en adéquation aux exigences réglementaires du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les tests ont pour but d'effectuer la production de réactifs nécessaires aux laboratoires pour effectuer et valider les tests *in vitro*, et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés dans les procédures de contrôles qualité ayant pour but la libération d'un lot pharmaceutique.

Ils sont effectués sur espèce cible. Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* alternatif.

Avantages et dommages :

Aucun dommage n'est attendu, un léger stress lié aux manipulations et injection des antigènes peut apparaître.

Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent.

Ces tests garantissent la qualité du produit pour les animaux et leur environnement.

Ces tests permettent la libération de vaccins qui protègent efficacement les animaux contre les maladies infectieuses, améliorent directement la qualité sanitaire des élevages et assurent un meilleur bien-être animal.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage ; jusqu'à 20 porcs, 20 ovins, 20 caprins et 20 bovins seront nécessaires sur 5 ans. Les nombres utilisés varient d'année en année et en fonction du nombre de production de sérums à effectuer.

Mise en avant des 3R :

Remplacement : La réalisation des contrôles *in vitro* nécessite la production de réactifs. Actuellement, cette production est possible uniquement sur un modèle *in vivo*. Aucun modèle *in vitro* alternatif n'a pu être mis au point.

Réduire : le nombre d'animaux est fixé par les laboratoires en fonction de leurs besoins et du type de réactifs nécessaire. Il n'est actuellement pas possible de le réduire.

Raffinement : dans ce projet, aucune souffrance ou stress significatif ne sont attendus.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements du milieu ont été mis en place dans les hébergements.

La Structure chargée du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux dans l'établissement utilisateur.

6335. La combinaison de microbulles de gaz avec les ultrasons fournit des alternatives sans précédent pour la délivrance locale de molécules chimiothérapeutiques dans les tissus tumoraux. L'oscillation des microbulles sous l'effet des ultrasons à proximité de l'endothélium des vaisseaux sanguins tumoraux, augmente transitoirement leurs perméabilités et permet ainsi la pénétration des molécules chimiothérapeutiques dans les tissus tumoraux sans effets délétères.

Des résultats prometteurs obtenus *in-vitro* nécessitent une validation préclinique. La souris Nude est le modèle le plus adapté. Le premier objectif sera de démontrer que les microbulles ciblées sont capables de se lier sur les vaisseaux tumoraux. Le deuxième objectif sera de mettre en évidence que l'association de ces microbulles ciblées avec les ultrasons potentialise la perméabilisation des vaisseaux aux traitements anticancéreux. Le troisième objectif sera déterminé si ces microbulles ciblées en combinaison avec les ultrasons potentialisent les effets thérapeutiques de ces traitements anticancéreux sur ces deux types de tumeurs.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par:



Remplacement: Dans une première approche expérimentale, nous avons réalisé des expériences in-vitro dont les résultats sont particulièrement encourageants et nécessitent d'être validés avec un modèle préclinique pertinent. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude in-vitro ou in-silico.

Réduction: Sur la base de nos études antérieures et d'une analyse statistique, notre étude nécessite 192 souris. Les groupes contrôles et expérimentaux seront constitués de 5 et 8 souris, respectivement. La différence de nombre d'animaux se justifie par le fait que nos études antérieures ont montré une variabilité interindividuelle plus importante dans les groupes expérimentaux que dans les groupes contrôles.

Raffinement: Les souris seront hébergées par groupe de 5-8 en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux seront observés une fois par jour.

6336. Certaines pathologies trachéales, notamment les cancers qui se développent à partir ou au contact de la trachée peuvent nécessiter de remplacer celle-ci. Ces pathologies ont en commun que leur évolution sans traitement aboutit au décès du patient par asphyxie. Le traitement de ces maladies repose essentiellement sur la chirurgie qui consiste à retirer le segment atteint et de raccorder les deux extrémités saines. Cependant, lorsque le segment à retirer est supérieure à 50% de la longueur de la trachée, il n'est pas possible de remettre simplement bout-à-bout les extrémités de la trachée car ceci expose à une suture sous tension et donc un échec du traitement entraînant le décès du patient. Depuis 60 ans les recherches dans ce domaine n'ont pas su apporter de solution durable. En effet les prothèses de trachées n'ont jamais fait la preuve de leur efficacité en raison des nombreuses complications occasionnées (infection, resserrement de la prothèse, érosion des organes autour de la trachée par la prothèse...).

Ainsi, le développement de nouveaux traitements apparaît primordial afin de pallier à cette problématique.

Récemment, notre équipe a proposé d'utiliser, pour remplacer la trachée, un montage utilisant un lambeau de peau du patient enroulé sur lui-même pour former un cylindre et renforcé par des cartilages de côtes issus du patient avec de bons résultats sur l'Homme. Les inconvénients sont la difficulté de découpe de ces cartilages et la survenue de fractures de ces derniers. Ces fractures entraînent un rétrécissement de la trachée et donc un risque d'asphyxie. Pour pallier à cela, il est nécessaire de laisser en place après l'intervention un tube en plastique dans la néo trachée pour rigidifier la structure le temps que celle-ci cicatrise (environ 1 semaine), ce qui entraîne des complications comme l'érosion de la néo trachée et la nécessité de ré-endormir le patient.

Cette technique est donc perfectible par un nouveau procédé remplaçant les cartilages par des anneaux prothétiques. Ils sont en titane et fabriqués sur mesure.

Cette technique permettrait de remplacer la trachée des patients, avec une intervention moins lourde (pas de prélèvement des cartilages, inutile de placer un tube en plastique dans la trachée pendant la période post opératoire) et avec moins de complications post opératoire (absence de risque de fracture des anneaux métalliques par rapport aux cartilages de côtes, absence de complications liées au tube en plastique laissé en place).

Avant de débiter ce projet, toutes les possibilités de l'exploitation des données obtenues par les méthodes alternatives (simulation sur logiciel informatique adapté et essais sur cadavre humain) ont été étudiées et prises en compte.

Avant de tester cette thérapie prometteuse chez les patients, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche et le devenir de cette trachée artificielle sur un modèle animal. Cet outil se décline en 2 matériaux différents: le titane "nu", et le titane dit "microporeux" supposé mieux s'intégrer aux tissus dans lesquels il est placé. Ces outils différents seront donc évalués au cours de ce projet, à l'aide de fibroscopie de la trachée et analyse microscopique de la trachée reconstruite, après sacrifice. Les animaux recevant des anneaux en titane "nu" serviront de groupe contrôle et ceux recevant les anneaux en titane "microporeux" seront le groupe d'étude.

Concernant les maladies respiratoires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine de par l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques respiratoires comparables à celles de l'homme.

Pour la totalité du projet nous utiliserons au maximum 14 porcs.

Le nombre d'animaux utilisés est déterminé par un test statistique permettant de déterminer un nombre nécessaire et suffisant d'animaux pour affirmer l'efficacité du nouveau traitement.

Le chercheur responsable de ce projet est chirurgien thoracique et sera assisté par des praticiens spécialisés (pneumologues et plasticiens) afin d'optimiser les procédures peu invasives et chirurgicales (fibroscopie de trachée, création de la néo trachée) permettant d'optimiser chaque procédure et de réduire ainsi le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. L'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange d'anesthésique et d'antalgique adapté (permettant à l'animal d'être correctement endormi et de ne pas ressentir la douleur au cours des procédures).

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une période d'acclimatation d'une semaine avant d'être inclus dans le protocole. Leur nourriture sera adaptée et ils seront stabulés en groupe dans des cages adaptées à leurs poids, afin de permettre un contact régulier entre congénères et de réduire leur stress. Leur environnement sera enrichi (activité de fouissement encouragée, « médecine ball », jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...) et adapté à chaque phase de l'expérimentation pour réduire leur angoisse. Tout constat d'un mal-être sera remonté au responsable du bien-être des animaux pour un examen approfondi et un traitement adapté. Si la douleur, la souffrance et l'angoisse ne pouvaient être réduites à leur minimum, une décision d'interruption d'expérimentation sera prise en concertation avec le vétérinaire sanitaire.

6337. A la différence des bactéries, il existe de nombreux virus pathogènes chez l'homme pour lesquels aucune molécule antivirale n'est aujourd'hui commercialisée. Ce projet concerne l'évaluation en modèle animal de nouvelles molécules à activité antivirale découvertes dans notre laboratoire. Avant un éventuel développement industriel pharmaceutique, il nous faut démontrer que ces composés sont actifs dans un modèle rongeur pour des virus choisis pour leur pathogénicité à la fois chez l'homme et chez la souris ou le hamster.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à ce projet, différentes familles de composés capables de restreindre fortement la réplication de nombreux virus à génome ARN dont des virus pathogènes humains émergents ont été préalablement sélectionnées en cultures de cellules infectées et ont été caractérisées de manière poussée *in cellulo*. Par la suite, les molécules présentant les meilleures caractéristiques antivirales seront étudiées par des expériences *in vivo* car elles seules permettront de montrer l'impact de ces molécules sur la pathogénèse virale. Les virus étudiés étant hautement pathogènes chez l'homme, les modèles utilisés induiront donc une infection sévère chez les rongeurs afin de reproduire au mieux la pathologie humaine que l'on souhaite traiter. Cependant, nous serons vigilants en ce qui concerne les signes de maladie et d'inconfort des animaux testés. L'administration de paracétamol et de buprénorphine a été prévue afin de réduire au maximum la douleur et la souffrance des animaux testés. Il est également important de noter, qu'à l'exception des groupes contrôles inévitables pour valider l'efficacité de nos molécules, peu (voire pas) d'animaux développeront une maladie ou des signes du fait d'une étude poussée préalablement effectuée en cellule. De plus, lorsque l'animal développe une forme sévère d'infection, la souffrance n'est pas de longue durée (24h maximum). Par ailleurs les administrations de virus et prélèvements de sang seront effectués sous anesthésie générale. Pour ce projet, nous serons amenés à tester 4 doses de 18 composés en souris sur 4 virus et 10 composés en hamsters sur 1 virus soit un maximum de 3504 souris et 1020 hamsters pour 5 ans dans un environnement confiné de type animalerie A3. Tous nos animaux sont hébergés en ISOcages, enrichies d'accessoires permettant aux animaux d'exprimer certains comportements naturels, participant ainsi à leur bien-être, dans un portoir ventilé sans transmission de vibration.

6338. Le cancer du foie est le cinquième type de cancer le plus fréquent et le troisième en terme de mortalité. Il est à 75% dû à des infections par les virus des hépatites B et C. Ces virus modulent des voies biochimiques impliquées dans la survie de l'hépatocyte, et potentiellement dans la carcinogénèse hépatique. Notre laboratoire a montré que la nétrine 1 était surexprimée à la fois dans les cellules infectées par les virus HBV et HCV *in vitro*, dans les prélèvements hépatiques infectés par ces virus, ainsi que dans les foies cirrhotiques, les plus exposés au cancer du foie.

Le projet vise, dans un premier temps, à étudier le rôle de la nétrine-1 sur la réponse inflammatoire hépatique, fortement corrélée à la cirrhose hépatique et à l'hépatocarcinome.

Dans un second temps, l'effet modulateur de la nétrine-1 sur l'apparition de l'hépatocarcinome (tumeur hépatique) sera évalué.

Pour cela, un modèle de souris sous-exprimant la nétrine 1 sera utilisé.

Nous pourrions alors valider la réalité *in vivo* des résultats obtenus *in vitro* et cliniquement (augmentation de la nétrine 1 au stade cirrhotique et de l'HCC; protection vis-à-vis de la mort des hépatocytes) ainsi qu'étudier les mécanismes de régulation de l'inflammation et de survenue de l'hépatocarcinome par la nétrine 1

Ces expériences permettront d'évaluer l'importance de nouvelles thérapies du cancer du foie et de déterminer leur éligibilité et leurs conditions d'utilisations pour un traitement chez l'Homme. Elles permettront également de comprendre les mécanismes impliqués dans la progression tumorale et la résistance de certaines tumeurs aux thérapies conventionnelles.

L'établissement des différentes parties de ce protocole expérimental tient compte des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement:

- Les effectifs définis dans ce protocole ont été déterminés grâce au comportement connu de ces modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats.

- Les nouvelles thérapies utilisées dans cette étude ont fait l'objet d'une validation *in vitro* qui nécessite d'être confirmée *in vivo*.

- Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux sera effectuée.

104 souris au total sont prévues dans les deux volets de ce protocole d'expérimentation animale.

6339. Malgré des avancées conséquentes dans sa prise en charge et son traitement, le cancer demeure une pathologie associée à un fort taux de mortalité.

Lors du développement d'un cancer, les cellules tumorales utilisent différentes stratégies pour échapper aux mécanismes de surveillance dont dispose l'organisme. L'une des stratégies les plus employées consiste à inhiber les cellules effectrices du système immunitaire. Ces mécanismes d'inhibition commencent tout juste à être compris. Il en résulte le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux, appelés immunothérapies, aux résultats cliniques très encourageant.

Des observations scientifiques récentes démontrent que contrairement à des cellules saines, les cellules tumorales expriment des protéines de rétrovirus endogènes. Ces protéines sont par ailleurs connues pour leur capacité à inhiber le système immunitaire, bien que les mécanismes de cette inhibition demeurent inconnus.

L'objectif de ce projet est donc :

- a) d'évaluer si l'expression de protéines d'enveloppe de rétrovirus endogènes par des cellules tumorales a un impact sur leur capacité à inhiber le système immunitaire
- b) d'identifier les mécanismes d'immunosuppression médiée par ces protéines de rétrovirus endogènes

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

La compréhension des mécanismes d'immunosuppression liés à l'expression de ces protéines pourrait rapidement aboutir au développement de nouvelles thérapies ciblées, en particulier des immunothérapies.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats nécessaires à la validation de l'hypothèse scientifique. Une définition précise et précoce des points limites (taille de la tumeur, absence de nécrose et d'altération de l'état général) et une surveillance adaptée des souris (mesure des volumes tumoraux 2 fois par semaine et pesée 1 fois par semaine) permet de limiter au maximum la souffrance animale. Le suivi de règles éthiques strictes permet d'assurer le maintien du bien-être animal.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

226 souris sur 2 ans.

6340. Plusieurs comportements et fonctions biologiques comme la température corporelle ou le cycle de veille-sommeil sont rythmiques. L'horloge principale régulant ces rythmes est présente dans le cerveau, dans les noyaux suprachiasmatiques. Mais il existe d'autres horloges disséminées dans l'organisme. On appelle « horloge » des structures qui expriment des gènes et des protéines dont la fréquence avoisine 24h.

L'hypothalamus est une petite structure cérébrale impliquée dans la régulation des systèmes monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline) ainsi que dans diverses fonctions (cognition, comportement maternel) et pathologies psychiatriques (tels que la dépression et l'addiction), et qui possède également une horloge circadienne.

Le but de ce projet est de comprendre l'intérêt de cette horloge dans l'hypothalamus. Nous déterminerons si en perturbant l'horloge exclusivement dans l'hypothalamus, nous pouvons voir des troubles dit addictifs ou de l'humeur, avec des altérations au niveau de la libération rythmique de monoamines.

Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques rendue incapable d'exprimer un gène horloge indispensable à la genèse des rythmes biologiques (*Bmal1*) par injection d'un virus. Cette approche va permettre d'étudier plus spécifiquement les fonctions de ce gène en observant les conséquences sur l'organisme de sa désactivation au sein d'une seule structure, l'hypothalamus. L'utilisation de rongeurs comme la souris nous permettra d'étudier des comportements complexes comme la dépendance aux drogues (à l'alcool ou à la nourriture) et la dépression, et d'utiliser des outils génétiques pour mieux cibler notre question.

Le projet total utilisera un nombre maximal de 364 souris sur 5 ans. Les différentes procédures ont généralement deux groupes à comparer donc un t-test sera utilisé. L'effectif au sein des groupes est déterminé dans le respect des règles statistiques en vigueur et de manière à obtenir une bonne reproductibilité des résultats ainsi qu'en prévention des éventuels aléas dus à la chirurgie.

En ce qui concerne le raffinement, les animaux sont hébergés en cages collectives ou individuelles avec du matériel d'enrichissement (nids en coton, bâtons à ronger). Les souris sont suivies quotidiennement. Toutes procédures chirurgicales se feront sous anesthésie/analgésie.

6341. Les pathologies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité et le vieillissement de la population en accroît l'importance. De plus, des pathologies comme l'hypertension artérielle, le diabète ou les pathologies ischémiques (coronariennes, cérébrales, rénales ou périphériques) surviennent d'autant plus fréquemment que l'âge des sujets avance. De manière générale, les femmes sont moins atteintes de maladies cardiovasculaires que les hommes mais cette tendance s'inverse après la ménopause laissant penser à un rapport de cause à effet entre la production d'hormones féminines (œstrogènes) et une protection des accidents vasculaires. Par ailleurs, le vieillissement artériel est associé à une moindre augmentation du diamètre des petites artères, réponse physiologique rapide à une élévation du flux intravasculaire stimulant le tapis de cellules endothéliales situé à l'interface avec le sang. La mesure de cette perte de dilatation flux-dépendante (DFD), à l'origine d'une perfusion inadéquate des tissus, est d'ailleurs largement employée en clinique mais reste mal connue au niveau microvasculaire. Dans ce contexte, au laboratoire nous nous intéressons depuis plusieurs années au rôle du récepteur aux œstrogènes  $ER\alpha$ , en particulier l'étude des forces mécaniques (flux, pression) sur la fonction vasculaire. Nous avons découvert que l'élévation chronique du flux sanguin intra-artériel induisait un remodelage adaptatif vasculaire dépendant de l'activation de  $ER\alpha$  par son ligand le 17-β-œstrogène (E2). En effet, des rats femelles ovariectomisés perdent leur remodelage artériel alors qu'une supplémentation en E2 la restaure. De plus, les souris déficientes en  $ER\alpha$  ne développent pas de remodelage. Le remodelage est associé à une plus forte réactivité de l'endothélium vasculaire avec en particulier une augmentation importante du pouvoir vasorelaxant de l'E2.

Il a été montré que l'E2 pouvait induire des effets génomiques ou non-génomiques (rapides) qui impliquent respectivement une action du  $ER\alpha$  nucléaire et membranaire. Ces deux modes d'action semblent entraîner des effets protecteurs différents selon les tissus mais les différencier reste très compliqué du fait de la boucle rapide entre internalisation et réexpression membranaire de  $ER\alpha$ . Nous aimerions particulièrement comprendre le rôle du récepteur

membranaire ER $\alpha$  et l'activation de sa voie non-génomique dans la réactivité vasculaire en particulier dans la réponse artérielle au flux aiguë ou chronique.

Cet aspect sera étudié en détail par l'utilisation d'un modèle de souris muté pour l'Arginine 264, site de méthylation du récepteur membranaire pour la transmission d'un signal d'activation du ER $\alpha$  à la membrane plasmique. Ainsi, différents outils pharmacologiques et moléculaires, devraient nous permettre de comprendre les fonctions vasoactives des œstrogènes et de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous aimerions étudier les voies impliquées dans le remodelage artériel, associé à l'étude en chronique de la réponse artérielle à une élévation de flux sanguin, ainsi que celles impliquées dans la dilatation flux dépendante en aigu.

A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur le rôle de la voie non génomique du récepteur ER $\alpha$  (récepteur membranaire) dans la mise en place de ce remodelage et de la dilatation flux dépendante.

Pour cette étude nous utiliserons des souris sur fond génétique C57BL6/N (souche de laquelle sont issues nos souris mutées) :

Il n'est pas possible d'utiliser les mêmes vaisseaux pour nos différentes expériences. Une fois l'évaluation du remodelage faite, les vaisseaux ne sont plus exploitables pour une analyse de la dilatation flux dépendante en aigu, et il en va de même pour l'étude protéique.

Le nombre total de souris nécessaires à l'établissement de nos différents groupes expérimentaux s'élève à 900. La reproduction et l'élevage de la souche se faisant au laboratoire nous utiliserons des animaux hétérozygotes R264A+/- mâles et femelles afin d'obtenir des animaux sauvages (+/+) et mutés R264A (-/-). 40 souris seront utilisées pour la reproduction portant à 940 le nombre total d'animaux utilisés.

D'après notre expérience, afin de permettre la significativité des résultats l'inclusion de 25 souris par groupe sera suffisante. Nous estimons que ce chiffre est un minimum du fait de la taille des artères. La précision et la complexité des techniques mises en œuvre par la suite peuvent aussi induire une variabilité importante.

En accord avec la règle des 3 R, et dans le but d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons le moins de souris possible.

Nous appliquons la règle des 3 R:

REMPACER

Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle non-animal, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal.

REDUIRE

Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Une analyse statistique des résultats sera réalisée (analyse de variance ANOVA).

RAFFINER

Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux, de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux).

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine.

6342. Les informations potentielles de douleur sont détectées par des neurones périphériques qui les envoient dans la moelle épinière. Dans la moelle, les informations sont mises en forme avant d'être transmises au cerveau où elles seront perçues comme douleur. Lors de douleur aiguë ou chronique, des stimulations habituellement non douloureuses le deviennent et les stimulations douloureuses le deviennent encore plus. Ceci est dû à des changements durables de la mise en forme du message sensoriel dans la moelle épinière. Le contexte global du projet proposé est la compréhension des mécanismes mis en jeu lors de ces changements durables dans la moelle épinière. L'objectif du projet est d'étudier comment l'activité électrique des neurones de la moelle épinière est changée lors de situations inflammatoires. A terme, ce projet devra permettre de dégager de nouvelles cibles pour le traitement de manifestations douloureuses. L'ensemble des expériences utilisera 648 souris pour les 4 années du projet. Ce projet a été élaboré en prenant en considération les exigences éthiques de réduction, raffinement et remplacement des procédures sur l'animal. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour atteindre une puissance statistique significative. Aussi, l'analyse des données sera menée au fur et à mesure de l'avancée des expériences et le nombre d'animaux sera ajusté en fonction des résultats. Les animaux seront maintenus en cage collective avec environnement enrichi. L'ensemble des procédures invasives seront effectuées sous anesthésie générale et des contrôles quotidiens de l'état de santé et du comportement des animaux seront effectués dès l'intégration de l'animal dans le processus d'expérimentation. Ce projet portant sur l'étude d'un système intégré et mature, il nous a été impossible de remplacer l'utilisation d'animaux par des tests *in-vitro*. Cependant, nous avons privilégié autant que possible les expériences *in vitro* ne nécessitant pas d'animaux supplémentaires.

6343. Le projet de recherche fondamentale que nous mènerons pendant cinq ans vise à comprendre comment notre cerveau met en mémoire les souvenirs, notamment ceux qui ont une forte charge émotionnelle, comme par exemple les événements associés à un stress ou à un traumatisme.

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux réseaux neuronaux de la mémoire de peur. La peur est une réaction innée, déclenchée lorsque l'on se sent menacé et observable chez toutes les espèces animales, tout comme chez

l'Homme. Les mémoires de peur lorsqu'elles sont trop intenses peuvent devenir invalidantes et aboutir chez l'homme à des pathologies comme les troubles anxieux ou les syndromes de stress post traumatique.

Il existe un très bon modèle expérimental pour étudier les mémoires de peur chez l'animal, celui du conditionnement de peur. Ce modèle appliqué au Rat consiste à associer un stimulus donné (par exemple un son) à un évènement aversif. Après seulement quelques associations, la présentation du son seul est capable d'induire un comportement de peur. Ce modèle animal s'est avéré très utile pour connaître les réseaux de la mémoire émotionnelle. Dans notre projet, nous étudierons les circuits impliqués dans le conditionnement de peur à l'odeur. En effet curieusement, ce modèle a été peu étudié jusqu'à présent alors que l'olfaction est cruciale pour le comportement du Rat et que chez l'homme les odeurs sont particulièrement aptes à induire des souvenirs fortement émotionnels.

Notre objectif est d'étudier comment les structures cérébrales (aires sensorielles olfactives et aires associatives) impliquées dans cet apprentissage, communiquent entre elles pour former une mémoire de peur à l'odeur. Pour cela nous utiliserons quatre approches complémentaires. Une première expérience visera à mesurer la libération de neurotransmetteurs dans ces structures lorsque l'animal fait l'apprentissage d'une peur à l'odeur. Une deuxième série d'expériences consistera à administrer des agents pharmacologiques pour identifier les récepteurs aux neurotransmetteurs responsables de la formation de cette mémoire de peur. Dans une troisième série d'expériences, nous enregistrerons l'activité électrique dans différentes aires cérébrales. Enfin, nous utiliserons des outils de pharmacogénétique pour inactiver certaines aires cérébrales et en mesurer l'effet sur la mémoire de peur ainsi que sur les l'activité électrique du réseau cérébral étudié.

Nous utiliserons des rats pour nos expériences car l'olfaction est la sensorialité dominante chez le rongeur et le système olfactif du rat ressemble beaucoup à celui de l'Homme. Comme la peur ne peut être appréhendée que sur des individus réactifs, c'est-à-dire, capables de reconnaître un danger, il est nécessaire d'utiliser des animaux éveillés pour ce type d'études. Quatre cent quatre-vingt animaux au maximum devraient être utilisés sur les cinq années que durera ce projet. Nous réduirons le plus possible le nombre d'animaux utilisés en nous basant sur notre propre expérience, mais aussi en consultant un biostatisticien qui déterminera le nombre minimal d'animaux par groupe. Nous garderons nos animaux dans des conditions d'hébergement et d'asepsie appropriées et nous utiliserons les stratégies expérimentales les plus adaptées pour minimiser leur souffrance. Nous mettrons en place un suivi clinique quotidien des animaux.

Comme le système olfactif du rat ressemble beaucoup à celui de l'Homme, les résultats de notre étude permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les mémoires de peur et les pathologies qui leur sont associées chez l'Homme. A plus long-terme, nous espérons que ces connaissances contribueront à une meilleure prise en charge de ces pathologies.

6344. Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de notre société sœur, leader mondial du diagnostic *in vitro*.

Le facteur tissulaire (FT) est une glycoprotéine transmembranaire constituant le principal initiateur de la coagulation plasmatique. Le FT est exprimé constitutionnellement par les fibroblastes de la paroi vasculaire et par les cellules épithéliales, mais son expression est aussi inductible dans les monocytes, les cellules musculaires lisses ou les cellules endothéliales. Le FT est un récepteur pour les facteurs de la coagulation VII et VIIa. Il est responsable de l'auto-activation du FVII en FVIIa. La liaison du FT avec le facteur VII ou VIIa permet la formation du complexe FT-VIIa, qui par l'activation des facteurs IX et X, déclenche l'activation de la coagulation, aboutissant à la génération de thrombine et la formation de fibrine. En plus de son rôle dans l'hémostase normale, le complexe FT-VIIa est notamment impliqué dans la survenue de thromboses associées aux maladies malignes, aux syndromes coronaires aigus et aux sepsis sévères.

La régulation de l'activité du complexe FT-FVIIa, essentielle au maintien de l'équilibre hémostatique, est assurée par l'inhibiteur de la voie du FT (TFPI). Cet inhibiteur (TFPI) inactive non pas le FT mais l'activité catalytique du complexe FT-facteur VIIa. Dans un premier temps, le TFPI se lie au facteur Xa, le facteur Xa est alors inhibé ; dans un second temps, le complexe Xa/TFPI va se lier au complexe facteur VIIa-FT pour former un complexe quaternaire facteur Xa/TFPI/ facteurVIIa/ FT, au sein duquel le facteur Xa, le facteur VIIa et le FT n'ont plus d'activité. Le TFPI limite donc l'activation de la coagulation induite par l'expression du FT. De par son action sur le FT, le TFPI intervient également dans de nombreuses situations physiopathologiques. Il est de ce fait nécessaire de disposer d'une méthode de dosage permettant de suivre les variations de son activité non seulement dans des situations de risques thrombotiques mais également dans le suivi de l'évolution d'autres pathologies, notamment cancéreuses.

Dans ce cadre, notre société sœur a développé des outils de dosage du TFPI. Ces outils se basent notamment sur l'utilisation d'un hybridome développé, il y a une vingtaine d'années, sécrétant un anticorps monoclonal (AcM) capable de reconnaître et de bloquer ultra-spécifiquement le TFPI. Cet AcM a été validé initialement sur des lots issus de production en condition *in vivo*. Des efforts considérables et des essais très poussés ont été réalisés pour un transfert de cette production en condition *in vitro* (bio-réacteur...). Dans le cadre d'investigations, une faible quantité d'anticorps produit *in vivo* servant de référence est nécessaire.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production *in vivo* par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 200 souris par an, sur 2 ans, soit 400 souris.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée soit par asphyxie par saturation progressive en CO<sub>2</sub>, soit par élancement.

6345. Le projet contribue à préparer un essai clinique d'une nouvelle technique d'imagerie des cancers de l'homme (lymphome B agressif et carcinome mammaire). L'étude chez le chien consiste en l'injection intraveineuse d'un radiomarqueur innovant, qui par ses caractéristiques physiques peut ensuite être suivi, lors de sa diffusion intracorporelle, par imagerie SPECT ou TEP. L'essai a pour objectifs de valider les doses d'injection en lien avec une étude dosimétrique, d'évaluer le degré de diffusion dans l'organisme (par imagerie) ainsi que la toxicité du radiomarqueur administré par cette voie.

Avant de proposer la nouvelle approche en essai clinique chez l'homme, plusieurs questions d'ordre scientifique et technique se posent encore et sont incontournables concernant ce radiomarqueur. Un modèle gros animal tel que le chien est indispensable pour valider la technique, les modèles murins étant insuffisants du fait d'un problème d'échelle (volume injecté, vitesse...) et ne permettant pas d'effectuer dans des conditions transposables à l'homme les études préalables d'imagerie et dosimétrie. Nous souhaitons dans cette étude valider, sur un nombre restreint d'animaux, ces aspects techniques d'administration du traitement et étudier la diffusion (biodistribution) du composé une fois injecté ainsi que valider la réalisation de ces imageries nucléaires avec ce nouveau marqueur.

Le Projet présenté ici sera réalisé sur le modèle chien, au total 12 animaux seront utilisés. La biodistribution du nouveau radiomarqueur ne peut être étudiée que par une évaluation *in vivo*. Cette approche est le seul moyen pour valider et conclure à la pertinence des études dosimétriques qui en découlent. Tout ceci implique, par là même, l'emploi des espèces cibles (chien) comme animal expérimental. Le protocole expérimental est standardisé par la transposition de ce qui se fait déjà lors des essais cliniques chez l'homme dans le domaine de la médecine nucléaire et assure une mise en place des procédures associées sans conséquence sur l'état général des animaux. La taille des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (12 animaux au total répartis en 2 lots de 6 animaux par lot). Les animaux seront hébergés dans une animalerie radioprotégée les 4 premiers jours du protocole puis rejoindront les locaux de l'animalerie conventionnelle. Durant toute leur utilisation, les animaux seront hébergés par groupes de 2 ou 3 individus. Des visites biquotidiennes par des animaliers seront réalisées, et une visite quotidienne sera assurée par un vétérinaire.

6346. L'épilepsie focale du lobe temporal est une des formes d'épilepsie parmi les plus réfractaires aux traitements anti-épileptiques actuels. En effet, cette forme d'épilepsie représente à elle seule la moitié des patients épileptiques en échec thérapeutique.

Les neurostimulations intracérébrales constituent une nouvelle approche thérapeutique efficace, désormais couramment utilisées dans de très nombreuses pathologies neurologiques comme la maladie de Parkinson. Toutefois, dans le domaine de l'épilepsie, des travaux restent à effectuer afin de pouvoir proposer ce traitement de manière plus large et routinière aux patients épileptiques en échec thérapeutique. Dans ce contexte, notre laboratoire développe de nouveaux protocoles de neurostimulation à visée thérapeutique. Pour atteindre cet objectif, deux principaux obstacles sont à surmonter: comprendre comment l'activité épileptique est générée par le cerveau, et comprendre comment la stimulation électrique du cerveau modifie l'activité épileptique.

Dans ce projet, nous étudions l'effet de protocoles de stimulation électrique locale du cerveau à différentes fréquences afin d'identifier les protocoles capables de diminuer l'activité épileptique chez un modèle souris d'épilepsie focale du lobe temporal. Dans le même temps, nous enregistrerons l'activité du cerveau afin de comprendre comment la stimulation électrique modifie l'activité épileptique.

Dans le strict respect de la règle des 3R, l'élaboration des procédures a objectivé la minimisation d'une hypothétique souffrance des animaux avec une détermination précise des points limites (Raffinement), le nombre d'animaux (n=250) inclus dans le projet a été calculé pour permettre une approche statistique fiable et pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses (Réduction), et enfin il faut préciser qu'il n'est pas envisageable d'utiliser une approche *in vitro* (Remplacement) en suppléance à l'approche *in vivo*.

6347. Nous testons une molécule agissant sur l'amélioration de l'hypoxie tumorale, afin de rendre les cellules plus sensibles à la chimiothérapie. Pour caractériser l'efficacité de cette molécule *in vivo*, il est indispensable de connaître précisément la dose minimale efficace. Une étude préliminaire datant de 2005 avait démontré que cette molécule était non toxique *in vivo* pour des doses de 60 à 1200 mg/kg. *In vivo* cette molécule avait été testée sur un modèle de tissus hypoxique humain, injectée dans un modèle murin. La caractérisation de cette molécule *in vitro* ayant avancé, il devient maintenant indispensable de définir précisément la dose minimum efficace *in vivo*. Pour cela, nous allons reprendre le modèle utilisé en 2005 et déterminer précisément la dose minimale efficace. Afin de favoriser la prise tumorale et ainsi limiter le nombre de souris utilisées, les souris seront irradiées la veille de l'injection des cellules tumorales. Une fois la tumeur formée, la molécule sera testée à différentes doses qui sont non toxiques au vu des

résultats préliminaires déjà obtenus. La réponse sera étudiée sur une cinétique allant de 1h à 24h après injection de la molécule. Chaque point de cinétique terminé, les tumeurs seront prélevées et congelées pour une étude en histopathologie. La reprise à l'identique du modèle utilisé en 2005 et les études préliminaires, nous permettent de réduire le nombre de doses testées, les points de cinétique et le nombre d'animaux ( $n \leq 145$ ). A ce stade, l'expérimentation animale est la seule méthode nous permettant de déterminer la dose minimale efficace *in vivo* nécessaire au processus de validation pharmacologique défini par les réglementations en vigueur. Il est impossible de remplacer l'expérimentation animale par une méthode alternative.

Au regard de la règle des 3R

Remplacer : L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'efficacité de cette nouvelle molécule. Néanmoins, celle-ci a déjà fait l'objet d'évaluations *in vitro* qui se sont révélées positives.

Réduire : Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés l'expérience se déroulera en plusieurs temps (pour tester des groupes de doses)

Enfin, les lots utilisés seront de 5 souris, ce qui est suffisant pour avoir une bonne idée de d'un effet thérapeutique intéressant (tests statistiques) et qui est très souvent utilisé dans diverses publications scientifiques.

Raffiner : Pour limiter toute souffrance animale inutile, les cellules tumorales utilisées seront implantées par voie sous-cutanée (moins douloureux que des injections orthotopiques bien évidemment invasives). De plus l'expérimentation sera stoppée dès que les tumeurs atteindront une taille entre 5 et 10 mm de diamètre (500 mm<sup>3</sup>).

6348. La rétine qui tapisse le fond de l'œil est composée de plusieurs types de cellules dont le bon fonctionnement est nécessaire pour la vision. L'atteinte de la rétine entraîne une baisse d'acuité qui peut être sévère, une perte du champ visuel, et peut faire basculer les patients dans le handicap. Les dégénérescences de la rétine font partie des causes de cécité les plus fréquentes dans les pays industrialisés. On retrouve parmi elles le glaucome, la dégénérescence maculaire sous sa forme sèche, la rétinopathie diabétique et la rétinite pigmentaire.

Le but de ce projet est de tester l'efficacité de substances neuro-protectrices dans des modèles de neuro dégénérescence chez le rat, la souris et le lapin.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'œil et l'absence pour l'instant de modèle alternatif, nous devons avoir recours à des animaux. Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience, nous permettent de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Le projet repose sur deux approches différentes ciblant chacune un type de cellules particulières de la rétine qui ont un rôle capital dans la vision: les photorécepteurs ou les cellules ganglionnaires.

Dans les 2 modèles, nous utiliserons des lapins, des rats ou des souris mâles ou femelles, âgées au minimum de 6 semaines. Au maximum 7425 rats, souris, lapins confondus par an sur 5 ans pourront être utilisés.

Les évaluations cliniques *in vivo* sont non invasives et comprennent des observations en lampe à fente sans nécessité d'anesthésie, des observations de la rétine par OCT (Optical Coherence Tomography) et une évaluation de l'activité électrique (ERG) de la rétine. Ces examens effectués en imagerie ou en électrophysiologie pour étudier le fonctionnement des cellules de l'œil ainsi que certains traitements administrés par voie péri ou intraoculaire se font sous anesthésie générale afin d'immobiliser l'animal et de ne pas occasionner de stress pour celui-ci. Ces examens complémentaires ainsi que ces voies d'administration sont également pratiqués chez l'homme ou l'animal en ambulatoire et en clinique vétérinaire.

Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des rongeurs et des lapins est effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum ainsi qu'un enrichissement des cages d'hébergement sont mis en place. Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique composé d'un vétérinaire et sera suivi par la structure de bien-être animal de l'établissement.

6349. Le virus de l'hépatite B (HBV) est responsable d'infections chroniques chez près de 250 millions de personnes dans le monde et favorisent le développement d'atteintes hépatiques (stéatose, fibrose) pouvant conduire à la cirrhose et/ou au carcinome hépatocellulaire (CHC). Les traitements actuels (analogues de nucléosides, interférons) ciblent la reverse transcriptase permettant ainsi de limiter la multiplication virale mais en aucun cas d'éliminer totalement le virus par persistance dans le noyau de la forme de résistance, l'ADNccc (covalent clos circulaire). Récemment, la preuve de concept de pouvoir induire la dégradation de ce génome a été apportée. Les inducteurs immunostimulants de la famille des ligands de Toll-Like-Receptor (TLR), et notamment les ligands de TLR 1/2, 3 et 4 ont démontré une efficacité certaine pour cette action du fait de l'interaction étroite entre HBV et cette voie de signalisation. Il a été démontré par des essais *in vitro* sur lignées cellulaires HepaRG et sur Hépatocytes Humains Primaires (PHH) l'efficacité antivirale de ces ligands : diminution des paramètres viraux dit classiques mais également une diminution de l'ADNccc, ce qui est très encourageant. Dans ce sens, l'étape suivante est l'expérimentation *in vivo* pour confirmer ces effets.

Le développement et l'utilisation thérapeutique de systèmes nanoparticulaires est aujourd'hui en plein essor et intéresse de nombreuses équipes de recherche dans le milieu médical. Ici, l'idée serait de développer un système original de vectorisation basé sur des nanoparticules composées d'un polymère biodégradable et biocompatible, permettant d'encapsuler des principes actifs de nature lipophile en leur cœur et/ou d'y adsorber à la surface des peptides d'intérêt.

Une administration spécifique nanoparticulaire à l'Homme apporte de nombreux avantages tels que la protection du principe actif contre le métabolisme humain, la diminution des effets indésirables engendrés par la molécule active, l'abaissement des doses nécessaires pour obtenir l'effet thérapeutique. Ici, la potentialisation des effets immunostimulants et antiviraux de ligands de TLR est imaginée et évaluée. Pour cela, ils seront encapsulés dans le cœur des nanoparticules et seront administrés avec ou sans ciblage spécifique des hépatocytes. Puis, ils seront évalués par expérimentation *in vivo* sur un modèle mimant l'hépatite B chronique par injection d'un AAV HBV (AAV : Adeno Associated Virus).

Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de l'essai car il requiert le fonctionnement de l'organisme entier afin d'évaluer l'effet du traitement candidat.

Le nombre de souris engagées dans ce projet sera réduit à son minimum, sans compromettre les objectifs initiaux. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées pour l'expérimentation seront appliquées en respectant le bien-être animal et en limitant au maximum la souffrance subie par l'animal.

Ce projet inclura au maximum 370 souris de type C57BL/6J.

6350. L'identification de gènes impliqués dans le développement musculaire présente des applications tant en élevage qu'en santé animale et humaine. Elle permet en effet de rechercher dans les populations d'animaux de rente les gènes favorables pour un développement musculaire optimal. Elle ouvre également des perspectives de nouveaux traitements thérapeutiques pour régénérer une croissance musculaire suite à certains traumatismes ou dans le cas de pathologies génétiques.

Les deux gènes étudiés dans le présent projet ont été identifiés suite à une série d'études menées avec des cultures de cellules de muscle de souris (lignée cellulaire C2C12) et leur invalidation est associée à une prolifération plus importante des cellules et/ou une augmentation de leur volume. Cette première étape était donc essentielle et participe au principe de réduction car elle a permis de sélectionner ces deux gènes d'intérêt sans utiliser d'animaux. Le but du projet est de confirmer cet effet *in vivo*, par l'analyse de souris transgéniques invalidées pour l'un ou l'autre gène, et de rechercher d'autres effets éventuels sur d'autres tissus. Le choix de la souris est justifié par i) son métabolisme musculaire proche de celui des animaux de rente et de l'homme, ii) la bonne connaissance de la génétique de cette espèce et l'abondance d'outils pour son étude, iii) ses caractéristiques de reproduction avec une forte prolificité associée à un faible intervalle de génération et iv) l'efficacité des outils disponibles pour éditer son génome. La méthode envisagée permet de limiter le nombre d'animaux en expérimentation, par des croisements raisonnés permettant l'obtention conjointe des souris invalidées et de leurs contrôles. Ainsi, par gène étudié, 220 souris seront nécessaires, incluant les animaux utilisés pour créer les lignées. Les principaux caractères analysés sur ces souris seront : le poids et le développement musculaire à la naissance, la croissance musculaire à 21 jours post-partum, le vieillissement. Les prises de poids sont réalisées le jour de la naissance, à 7 jours, à 14 jours et à 21 jours post-natal. Les études sur le développement et la croissance musculaire nécessiteront des prélèvements post-mortem d'échantillons musculaires. Au total, 440 souris seront utilisées pour l'ensemble du projet sur une durée de 5 ans, incluant la cryopréservation des lignées ainsi générées. Cette étude permettra de mieux comprendre les voies métaboliques impliquées et d'appréhender les voies thérapeutiques envisageables. Il n'implique pas de stress particulier, ni de protocoles invasifs chez les animaux. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (sopalin). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela permet d'intervenir rapidement et de manière appropriée si un problème était constaté. Ce projet, mené en collaboration entre différents laboratoires, fait l'objet d'une thèse financée.

6351. L'infarctus du myocarde, appelé couramment crise cardiaque, est une destruction d'une partie du cœur qui se produit lorsqu'une artère coronaire (vaisseau sanguin apportant le sang et l'oxygène au cœur) s'obstrue. Il faut savoir qu'il y a environ 120000 infarctus du myocarde en France tous les ans avec un taux de mortalité autour de 25%. L'angioplastie, technique percutanée permettant de déboucher l'artère coronaire avec la pose d'un stent a contribué à améliorer ce taux. Le stent est un dispositif, le plus souvent métallique, maillé et tubulaire, qui est glissé à l'intérieur de la coronaire et permet de la maintenir ouverte. Néanmoins, une coronaire peut à nouveau se boucher au niveau d'un stent, mais la création de stent « actif » permet de limiter grandement cette réaction indésirable, ce stent diffusant une molécule protectrice ou étant recouvert par une molécule empêchant la formation d'un caillot. De nombreux stents sont donc actuellement en cours de développement.

Notre projet prévoit de comparer 3 stents fait du même type d'alliage mais différents au niveau de leur surface qui rentre en contact avec la paroi vasculaire et les éléments du sang circulant: des stents "nus" ne diffusant aucun médicament, des stents "actifs" diffuseur d'un médicament anti-inflammatoire actuellement commercialement disponibles, et des stents "nus" sur lesquelles nous aurons appliqué un nouveau recouvrement que nous souhaitons tester. Ce dernier est basé sur le greffage d'une molécule mimétique du CD31 qui est fortement exprimée par les cellules qui tapissent la face intérieure des artères coronaires. Plusieurs données obtenues *in vitro* indiquent que cette nouvelle approche innovante permet de limiter fortement la réaction des plaquettes et des leucocytes au contact avec le stent et, en même temps, encourage une croissance "physiologique" des cellules vasculaires sur les mailles du stent. Cependant, seule l'utilisation *in vivo*, dans une artère coronaire et en conditions de flux artériel peut permettre d'apprécier les bienfaits espérés de ce recouvrement, avant de pouvoir le tester sur l'Homme. Nous avons choisi



d'effectuer les études *in vivo* chez le porc parce que 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 afin de poser de manière percutanée 3 stents de même type/animal, de les réveiller et les surveiller pendant une semaine afin que les stents puissent bien s'implanter et interagir avec le sang circulant et les cellules de la paroi vasculaire, puis de les euthanasier afin de récupérer les coronaires et étudier la réaction tissulaire sous microscopie électronique à balayage. Sur la base de la variabilité du pourcentage de recouvrement par les cellules vasculaires obtenu avec les stents "nus" et "actifs", nous avons calculé que le nombre minimum de stents à implanter pour atteindre une puissance statistique suffisante est de 27 (9/type). Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux, 3 lots de 3 animaux sont prévus, avec 3 stents de même type par animal. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance, et des vétérinaires contrôleront 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 pendant toute l'expérimentation.

6352. Les maladies auto-immunes résultent d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui s'attaque à certains constituants de l'organisme (c'est le cas du diabète de type 1, de la sclérose en plaques ou encore de la polyarthrite rhumatoïde), alors qu'il est censé les tolérer et défendre l'organisme vis-à-vis d'agressions extérieures. Ces maladies évoluent de façon chronique tout au long de la vie, avec des phases de poussées et de rémissions.

Un constituant ciblé par le système immunitaire dans une maladie auto-immune est appelé auto-antigène. L'induction d'une tolérance immunologique spécifique pour l'auto-antigène paraît être primordiale dans le traitement de ces maladies. A ce jour, il n'existe pas de thérapies basées sur une telle induction.

Une société de biotechnologie a développé un procédé pour rééduquer le système immunitaire à percevoir les auto-antigènes comme faisant bien partie de l'organisme. Le procédé, dit de « tolérisation », exploite un phénomène naturel qui consiste à accrocher les auto-antigènes aux globules rouges circulant dans l'organisme. Lorsque ces derniers sont détruits, les auto-antigènes sont « scannés » par des cellules de la rate et du foie qui indiquent au système immunitaire de les tolérer. Ce concept a été validé préalablement chez la souris. L'objectif de ce projet est donc maintenant de démontrer l'efficacité de ce procédé dans un modèle expérimental plus proche de l'homme. Le modèle choisi est le primate non humain (PNH), dont le système immunitaire, dans son fonctionnement physiologique et pathologique, est très proche de celui de l'homme.

Au maximum 36 animaux nés et élevés dans des élevages agréés seront inclus dans le projet. En accord avec la règle des 3R, le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour analyser les données. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (limitation des volumes prélevés, prélèvements et injections sous anesthésie générale). Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés au minimum par deux dans des modules individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront d'un programme défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement pour l'enrichissement de leur milieu de vie.

6353. La malnutrition désigne un état pathologique causé par la carence (sous-nutrition) ou l'excès d'un ou de plusieurs nutriments (sur-nutrition). Elle peut être provoquée par un apport alimentaire insuffisant, un déséquilibre de la balance nutritive, ou à une altération de la digestion et une mal absorption des nutriments.

Actuellement, la sous-nutrition est considérée comme un problème de santé majeure dans les pays à faible revenu. En effet, la sous-nutrition chronique, notamment chez les enfants, affecte la santé de l'hôte et son développement (un retard de croissance juvénile sévère). La sous-nutrition n'est pas simplement provoquée par une carence alimentaire mais résulte également d'une interaction complexe « environnement-hôte » et est souvent associée à un changement significatif dans la composition du microbiote intestinal (dysbiose) et de sa fonctionnalité. Les essais cliniques ont montré, qu'une intervention nutritionnelle thérapeutique seule est insuffisante pour restaurer un microbiote intestinal sain et améliorer l'état de santé des enfants sous-nourris, montrant ainsi la nécessité de comprendre le rôle du microbiote dans la régulation de l'homéostasie de l'hôte et d'identifier les causes de son dysfonctionnement qui peuvent contribuer à la malnutrition.

Le microbiote intestinal peut être modulé par plusieurs facteurs comme dans le cas de l'utilisation de certains médicaments, des nutriments ou même des bactéries lactiques de type lactobacille (gram-positif). Des données récentes ont montré le rôle important de ces dernières dans le maintien de l'équilibre du microbiote intestinal et de l'homéostasie de l'hôte. De plus, nos données au laboratoire ont permis de mettre en évidence un rôle bénéfique de certaines souches de lactobacille sur la promotion de la croissance chez de larves de drosophile et chez la souris monoxénique (dont le microbiote intestinal est réduit à une unique souche bactérienne) mises sous carence nutritionnelle. Ces résultats sont intrigants d'autant plus qu'une baisse de la population des lactobacilles est observée dans le microbiote des souris conventionnelles mises sous régime carencé.

De ce fait, nos résultats suggèrent fortement que ces micro-organismes pourraient être utilisés comme un probiotique pour traiter la malnutrition et les pathologies qui y sont associées notamment le retard de la croissance juvénile.

Ces observations légitiment la réalisation d'une étude scientifique qui devrait permettre de mieux comprendre:

- 1) les relations entre la sous-nutrition et le retard de croissance,
- 2) l'impact de la sous-nutrition sur la composition du microbiote intestinal dans un contexte génétique spécifique,
- 3) d'évaluer les effets bénéfiques de souches de lactobacilles, dont la fonctionnalité a été qualifiée à l'aide du modèle drosophile, sur la restauration de la dysbiose intestinale ainsi que le retard de croissance observé chez les souris juvéniles.

Nous pensons que notre étude va identifier un rôle important de l'utilisation de souches de lactobacilles sélectionnées qui, combinée à une thérapie nutritionnelle, va permettre d'améliorer l'état de santé de l'hôte (ex: restauration du retard de croissance juvénile) dans des conditions de malnutrition chronique. Cette dernière est connue pour toucher actuellement plus de 160 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans dans les pays à faible et moyen revenu.

Nous prévoyons l'utilisation d'un maximum de 576 souris sur une période de 3 ans tout en respectant les règles des 3R : en utilisant le nombre d'animaux a minima dans notre étude et tout en respectant leur bien-être et en soulageant leur douleur si elle est provoquée. Ce nombre de souris nous permettra de tester l'effet protecteur du probiotique *Lactobacillus* sur l'équilibre entre les différentes communautés microbiennes et contre le développement du retard de croissance provoqué par le régime de sous-nutrition. L'utilisation d'animaux est essentielle parce que interactions entre microbiote et hôte ne peuvent pas être étudiées *in vitro*. La validation des résultats obtenus chez la *Drosophile* à l'aide d'un organisme modèle mammifère comme la souris est nécessaire afin d'envisager la transposition de nos découvertes chez l'homme.

6354. Les produits chimiques et agrochimiques doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin de définir les conditions sécurisées de leur manipulation sur leur lieu de fabrication, leur stockage, leur transport et leur manipulation par les utilisateurs.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 83.

Ces tests répondent aux normes OCDE suivantes:

- OCDE 404 pour l'évaluation de l'irritation cutanée. Etudes réalisées chez le lapin (1 à 3 selon des résultats obtenus sur le premier animal). Cette étude n'est réalisée qu'après évaluation de toutes les données relatives au caractère éventuellement corrosif ou irritant pour la peau du produit chimique testé au cours d'une analyse de leur valeur, telle que décrite dans le Document IATA pour l'irritation et la corrosion de la peau. Cette évaluation couvre les données existantes comprenant les données humaines *in vivo*, les données *in vitro*, les propriétés physico-chimiques et les données autres que provenant d'essais. Si cette analyse ne permet pas de conclure, des essais supplémentaires doivent être effectués, en partant des essais *in vitro*, les essais *in vivo* n'étant considérés qu'en dernier ressort.

- OCDE 405 pour l'évaluation de l'irritation oculaire. Etudes réalisées chez le lapin (1 à 3 selon des résultats obtenus sur le premier animal). Cette étude ne sera réalisée qu'après avoir évalué, par une analyse du poids de la preuve, toutes les données relatives au caractère potentiellement corrosif ou irritant de la substance pour les yeux. Ces données comprennent les résultats d'études existantes menées sur des humains et/ou des animaux de laboratoire, des données établissant l'effet corrosif ou irritant pour l'œil d'une ou plusieurs substances structurellement proches de la substance d'essai, des données démontrant la forte acidité ou alcalinité de la substance, et des résultats d'essais *in vitro* ou *ex vivo* de corrosion cutanée et de corrosion/irritation oculaires validés et acceptés.

Un protocole d'analgésie et d'anesthésie permet d'éviter toute souffrance pendant ces études.

- OCDE 423 ou 420 ou 425 pour l'évaluation de la toxicité systémique aiguë par voie orale. Etudes réalisées chez le rat (entre 3 rats et environ 20 rats, selon les effets observés). Ces études sont menées après avoir rassemblé toutes les informations disponibles sur la substance d'essai (identité et structure chimique, propriétés physico-chimiques, résultats obtenus dans tous autres essais de toxicité *in vitro* et *in vivo*, données toxicologiques de substances structurellement apparentées et l'usage escompté). Ces informations seront utiles dans le choix de la dose initiale appropriée.

Il ne faut pas administrer des substances d'essai à des niveaux de dose qui provoquent des douleurs et une détresse importante du fait de propriétés corrosives ou sévèrement irritantes. Au cours de l'essai, on doit tuer avec humanité les animaux moribonds et les animaux qui souffrent de façon manifeste. Ces animaux doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai.

- OCDE 402 pour l'évaluation de la toxicité systémique aiguë par voie cutanée. Etudes réalisées chez le rat (1 rat par dose pour l'essai préliminaire permettant de déterminer la dose de l'essai principal, puis compléter à la dose déterminée avec 4 rats supplémentaires).

Les produits ne doivent pas être administrés à des doses provoquant une douleur importante ou une détresse par un mécanisme potentiellement corrosif ou fortement irritant. Un essai *in vitro* peut être mené pour vérifier le potentiel corrosif du produit chimique d'essai. On doit euthanasier avec humanité les animaux moribonds et les animaux qui souffrent de façon manifeste. Ces animaux doivent être pris en compte dans l'interprétation des résultats au même titre que les animaux morts au cours de l'essai.

- OCDE 406 pour l'évaluation de la sensibilisation. Cette norme décrit 2 tests: le test de Magnusson et Kligman, dit de maximalisation (avec utilisation d'un adjuvant) et le test de Buehler dans lequel le produit à étudier n'est appliqué que par contact cutané. Etudes réalisées chez le cobaye (Magnusson et Kligman: minimum 15 animaux. Il peut être nécessaire, selon les résultats obtenus, de compléter avec le même nombre d'animaux.

Par ailleurs, pour ces 2 tests, la norme indique qu'il est nécessaire de vérifier la sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale utilisée tous les 6 mois en utilisant une substance dont le pouvoir sensibilisant est connu pour être léger à modéré (15 animaux pour le test de Magnusson et Kligman et 30 animaux pour le test de Buehler).

Les relations quantitatives structure-activité et les modèles *in vitro* ne sont pas encore suffisamment élaborés à l'heure actuelle pour jouer un rôle significatif dans l'évaluation du potentiel de sensibilisation cutanée des substances ; on doit donc continuer à déterminer ce potentiel sur des modèles *in vivo*.

- OCDE 429 ou 442B pour l'évaluation de la sensibilisation. Ces études sont réalisées chez la souris (1 souris pour les essais préliminaires qui permettent de déterminer la dose maximale non toxique et non irritante qui sera utilisée dans le test principal. Il peut être nécessaire de tester plusieurs doses en essai préliminaire ; 20 souris pour le test principal soit 1 lot contrôle et 3 doses du produit à étudier).

Il s'agit de la deuxième norme, avec l'OCDE 406, permettant d'évaluer le pouvoir de sensibilisation cutanée de substances chimiques chez les animaux. Elle constitue une méthode de remplacement mais ne doit pas systématiquement remplacer les essais sur cobayes. La méthode ELGL, mise en œuvre *in vivo*, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Elle est néanmoins susceptible de réduire le nombre d'animaux requis à ces fins. En outre, l'ELGL propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact.

6355. La formation du personnel est nécessaire et obligatoire pour la mise en œuvre des techniques inhérentes aux projets ayant recours aux animaux. Cette formation ne peut pas être effectuée sans le recours à l'animal. Ce projet a pour objectif d'encadrer la formation des nouveaux techniciens animaliers et les réévaluations régulières des personnes déjà formées aux manipulations « *in vivo* » standards sur le cheval, les moutons, les poules, les poulets, les oies, les dindes et les porcs, sous la responsabilité de manipulateurs référents (système de compagnonnage). Ce système de formation permet d'avoir des personnes en charge des gestes techniques parfaitement formées et compétentes et travaillant de façon harmonisée.

Ce projet engendrera l'utilisation d'au maximum 10 chevaux, 10 moutons, 20 poules domestiques, 10 oies, 10 dindes et 10 cochons sur une période de 5 ans. Le degré de gravité est considéré comme léger au vu des techniques pratiquées. Chaque animal est observé quotidiennement au moins une fois par jour durant toute la durée de son hébergement. Dans le cas où les animaux présenteraient des signes cliniques, des soins appropriés seront réalisés. La prise en charge d'un animal ayant des signes de maladie est assurée par un vétérinaire. Suite à leur utilisation les chevaux sont soit réutilisés soit replacés en tant qu'animaux de compagnie. Le remplacement est également possible pour les miniporcs en fonction des possibilités.

Les autres animaux sont euthanasiés selon des méthodes recommandées par la réglementation et approuvées par le Comité d'Éthique (CE) et la Structure de Bien-être Animal (SBEA).

Mise en œuvre des 3R

Remplacement :

Il est indispensable d'utiliser des animaux vivants afin de se former aux techniques d'injection et de prélèvement et ainsi, de pouvoir observer qu'aucun impact clinique n'est constaté suite à la réalisation des gestes techniques. Tous les gestes techniques ont été revus et sont approuvés par la SBEA.

Réduction :

Les animaux recrutés pour la formation sont des animaux réformés d'expérimentation animale, excepté pour les poules ou poulets. Il est possible également de recruter des animaux n'ayant pas fait l'objet d'une étude, dans ce cas l'animal pourra être réutilisé dans un autre protocole. Le nombre d'animaux utilisés sera raisonné selon le nombre de personnes à former, l'expérience de ces personnes, le nombre de techniques à apprendre, la difficulté technique, le nombre de techniques réalisables sur un même animal et sur la base des expériences terrain comme étant le minimum pour s'assurer qu'une personne maîtrise un geste technique. Aucun animal ayant subi une procédure sévère ou ne présentant pas un bon état général ne pourra être utilisé pour la formation.

Raffinement :

Des moyens sont entrepris au niveau du projet ou des procédures pour réduire le stress et le niveau de souffrance : anesthésies raisonnées pour certaines techniques, choix des techniques en fonction de l'avantage expérimental procuré par rapport à la souffrance occasionnée. Un programme d'enrichissement est en place pour toutes les espèces.

6356. Le fer est un élément essentiel pour les organismes vivants. Il est impliqué dans des mécanismes physiologiques indispensables à la vie tels que la synthèse de l'hémoglobine. L'absorption du fer dans le duodénum est étroitement régulée en fonction des besoins. D'autre part, il n'existe pas de système actif d'excrétion du fer. L'hepcidine, petit peptide sécrété par le foie, a un rôle clé dans la coordination de l'utilisation et du stockage du fer et adapte l'entrée du fer aux besoins de l'organisme. Elle agit en se liant à la ferroportine, un exportateur de fer présent principalement à la surface des cellules intestinales et des macrophages ce qui induit sa dégradation. La disparition de la ferroportine de la surface cellulaire inhibe l'efflux de fer des cellules intestinales et la sortie du fer des macrophages, provoquant une diminution du fer dans l'organisme.

Dans ce contexte, plusieurs projets de recherche seront développés :

1) Identification de la cible d'une protéine hépatique essentielle dans le métabolisme du fer. Des mutations dans le gène codant pour cette protéine conduisent chez l'homme à une maladie génétique caractérisée par une anémie sévère. Toutefois son mécanisme d'action reste méconnu. Dans ce projet nous nous attacherons à le caractériser.

2) Les maladies génétiques résultant en une surcharge en fer comme l'hémochromatose, les thalassémies et les syndromes myélodysplasiques, ou résultant en une anémie comme les maladies inflammatoires chroniques affectent des millions de personnes dans le monde. La surcharge en fer en particulier dans le foie conduit si elle n'est pas traitée à des fibroses hépatiques, cirrhoses hépatiques et des hépatocarcinomes. L'anémie quant à elle est un facteur aggravant de toutes les maladies chroniques. Le facteur commun de ces maladies est une dérégulation de l'expression de l'hepcidine. La matriptase-2 est un inhibiteur de l'hepcidine, inhiber ou augmenter son activité permettrait de stimuler ou inhiber l'expression de l'hepcidine et ainsi réduire ou augmenter l'absorption intestinale de fer. Dans ce projet diverses molécules agissant sur la matriptase-2 seront testées pour leur capacité à corriger la surcharge en fer ou l'anémie dans les modèles murins de ces maladies.

3) Rôle du fer dans la pathologie du NAFLD La stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) est une maladie fréquente touchant 14% à 27% de la population dans les pays industrialisés. Elle représente un problème majeur de santé à l'échelle mondiale. Cette stéatose non liée à l'alcool peut être isolée ou associée à une inflammation et peut progresser vers la stéatohépatite non alcoolique (NASH) avec un risque d'évolution vers la fibrose et, à terme, la cirrhose et l'hépatocarcinome. Actuellement, il n'existe pas de traitement spécifique pour faire régresser la stéatose et prévenir la transition vers la NASH. Des études cliniques indiquent que de façon générale, une augmentation du fer dans le foie est associée à un mauvais pronostic pour les patients NAFLD. Par rapport aux sujets sains, les niveaux d'hepcidine dans l'urine, le sérum et le foie sont élevés chez les patients NAFLD présentant un excès de fer. D'un point de vue thérapeutique, il a été montré que l'élimination du fer par saignées améliore l'évolution de la maladie chez les patients NAFLD. Toutefois, cette approche thérapeutique souffre d'un certain nombre de limitations (telles que l'anémie) chez les patients NAFLD, ce qui rend la mise au point de nouveaux outils thérapeutiques nécessaire. Dans ce projet de recherche nous évaluerons le rôle du fer dans la sévérité de la maladie et nous développerons des outils thérapeutiques afin de diminuer l'expression de l'hepcidine et ainsi réduire l'accumulation en fer dans le foie observée dans cette pathologie.

Afin de répondre à ces objectifs le nombre d'animaux utilisés sera de 2350 souris sur 5 ans en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques (Mann-Whitney). Ces tests seront réalisés avec le logiciel GraphPad Prism, le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure.

Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement) :

1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études *in vitro* dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces gènes dans la régulation du métabolisme du fer. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduisent pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et 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. Des études préliminaires nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons déjà validé certaines de nos approches expérimentales *in vitro* permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris permettent d'acquérir des données fiables. Les rongeurs utilisés sont consanguins et de même âge réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables.

3- Raffinement : 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'enrichissement de leur environnement (coton ou sopalin afin qu'ils puissent faire un nid) et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). De plus une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée avant l'expérimentation.

6357. Ce projet a pour objectif de produire des virus et bactéries nécessaires à la fabrication de vaccins ou à la réalisation de Contrôle Qualité permettant la mise sur le marché de lots de vaccins. Ceci permet d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne. Il n'existe actuellement pas de modèle alternatif *in vitro* pour produire ces virus et bactéries.

Avantages et dommages :

Les dommages liés aux tests sont une souffrance pour les animaux et une augmentation du stress due aux injections et aux manipulations par l'homme. Les animaux développent les symptômes liés aux maladies testées.

Les bénéfices attendus de ce projet sont de participer à la production de vaccins et de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur. Le recours aux espèces alternatives permet aussi de ne pas utiliser les espèces cibles, qui seraient dans ce projet des chiens et des chevaux.

Informations sur les espèces utilisées :

Sur cinq ans, les nombres maximaux d'animaux utilisés sont de 4046 souris et de 4489 hamsters. Ce nombre, basé sur les données actuelles, est fonction du nombre de productions à réaliser.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : il n'existe pas de méthode de remplacement pour la production de lots de semences primaires ou de souches d'épreuves.

Réduction : le nombre de rongeurs utilisés correspond au nombre nécessaire pour la production des lots de semences primaires, des souches d'épreuves et des contrôles les validant. Il n'est actuellement pas possible de le réduire.

Raffinement : Des points limites spécifiques aux pathologies et les plus précoces possibles sont déterminés et appliqués. Le personnel vérifie régulièrement l'évolution de l'état général et si les points limites spécifiques sont atteints. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements, dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires et suivis par un personnel spécifiquement formé. Les conditions d'hébergement varient en fonction de l'espèce et de l'âge des animaux pour maximiser leur confort.

La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

6358. Le cancer colorectal est le 3ème cancer le plus fréquent en France. Il y a peu de traitements proposés et la solution la plus efficace pour éviter la dissémination dans l'organisme est d'enlever la tumeur par chirurgie et de bénéficier de traitements par chimiothérapie associée ou non à un traitement visant à réduire la vascularisation de la tumeur. Il est maintenant établi que le système immunitaire joue un rôle important dans l'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies mais il présente un effet nocif direct.

De plus, il a été mis en évidence que différents composés de la flore intestinale (microbiote intestinal) pouvaient avoir un rôle dans la protection et dans le développement du cancer colorectal. De récents travaux publiés chez la souris ont aussi démontré l'importance du microbiote intestinal dans l'efficacité anti-tumorale d'immunothérapie et de chimiothérapies contre le cancer colorectal.

Notre projet vise à utiliser ces informations pour permettre de faire un vaccin contenant des cellules intestinales ou des contenus intestinaux de patients ayant un cancer colorectal traités par un agent chimiothérapeutique.

La vaccination avec ces composés pourra permettre de produire une réponse immunitaire et un changement du microbiote intestinal qui permettrait une diminution partielle ou totale de la croissance tumorale.

Nous souhaiterions aussi mettre en évidence le rôle et les mécanismes de différents facteurs dans ces cellules intestinales de la vaccination. Nous utiliserons différents modèles de souris telles que des souris dépourvues de flore microbienne (rôle du microbiote), ou des souris dépourvues de différents récepteurs ou protéines que nous pensons impliqués dans la reconnaissance des cellules vaccinées. Afin de diminuer les facteurs employés nous nous sommes concentrés sur des mécanismes précis.

Par ailleurs, afin de caractériser la composition de la flore intestinale des patients, nous utiliserons aussi le contenu intestinal de ces patients atteints d'un cancer colorectal pour réaliser des vaccinations. Nous étudierons la conséquence de la vaccination sur la croissance de lignée tumorale du cancer. De ce fait nous pourrions identifier les contenus de l'intestin qui permettent un ralentissement de croissance tumorale (répondeur) et ceux qui accélèrent ou n'ont aucun effets (non répondeur). Nous tenterons d'identifier les bactéries et les cellules des contenus intestinaux des patients susceptibles d'activer le système immunitaire anti-tumoral de ces prélèvements de patients (bactéries bénéfiques). L'identification de ces bactéries nous permettrait de concevoir des traitements pré/probiotique afin de changer le microbiote des patients pour leur permettre de diminuer ou de mieux réagir aux traitements chimiothérapeutiques.

Ces résultats devraient permettre de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une transplantation fécale (avec des bactéries bénéfiques) afin de permettre d'améliorer la réponse aux traitements de chimiothérapies.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous utiliserons le modèle animal, la souris, car nous étudions la réponse à la vaccination c'est à dire la réponse immunitaire et la mémoire immunitaire et il n'y a que dans les modèles animaux (qui miment bien le système de l'Homme) que nous pourrions voir cela. En effet, du fait de sa complexité, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire hors d'un organisme vivant. L'étude sur animaux est essentielle car c'est le seul modèle qui permet l'étude concomitante du système immunitaire, de la flore et l'évolution pathologique, la culture *in vitro* ne présente pas ces avantages mais nous a permis de sélectionner le vaccin à utiliser. Par ailleurs, le modèle de tumeur utilisé dans ce projet a été développé uniquement chez la souris et est indispensable à l'étude de l'immunité anti-tumorale dans le contexte du même hôte.

Ce projet se déroulera sur plusieurs années et nécessitera plusieurs expérimentateurs. Le projet durera 5 ans et nécessitera 3607 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, l'étendue de la diversité de la flore intestinale ainsi que les différentes voies de signalisation étudiées.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. D'une part, nous avons minimisé les animaux utilisés en faisant des expériences préliminaires pour valider les cellules utilisées. D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, un anesthésique local sera appliqué à chaque injection. Par ailleurs, les souris seront observées quotidiennement pour être soignées dès le moindre problème de santé.

6359. Les chiens sont régulièrement utilisés dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible). Ils sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale,) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible).

Dans ce type d'étude, un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les urines, détection dans les tissus) ou/et un suivi des modifications hématologiques, biochimiques et ou enzymatiques est également possible.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier. Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales: la procédure d'administration du produit à tester, la procédure de prélèvements sanguins répétés. De plus, des prélèvements d'urine, de différents tissus ou organes seront parfois nécessaire.

Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires. Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés par groupe ou de façon individuelle (que si nécessaire pour un suivi de consommation d'aliment ou d'eau, pour des recueils d'urine...par exemple).

Des jouets, tablettes... sont présents dans les hébergements pour enrichir le milieu.

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place permettant l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets du produit sur l'animal (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...).

Au total, au maximum 500 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

6360. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/3500 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine (sur chromosome X) à l'origine d'une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché.

En attendant la validation et mise en place de thérapies curatives visant à ré-exprimer la dystrophine, la thérapie pharmacologique est une des approches envisageables pour pallier les processus physiopathologiques liés à l'absence de dystrophine.

Avant le passage chez l'homme, l'efficacité thérapeutique des approches de thérapie est aujourd'hui validée à l'aide essentiellement de deux modèles animaux de la DMD : la souris mdx et le chien GRMD (pour Golden Retriever Muscular Dystrophy), tous deux porteurs d'une mutation dans leur gène de la dystrophine. Ces 2 modèles, bien que largement utilisés, présentent cependant un certain nombre d'inconvénients : 1) La souris mdx ne reproduit que partiellement les lésions tissulaires retrouvées chez les patients DMD et est relativement peu malade; 2) Le chien GRMD présente des lésions tissulaires proches et une évolution semblable à la maladie retrouvées chez les patients DMD, mais reste un modèle de gros animal coûteux et lourd à manipuler. Enfin, l'établissement de cohortes statistiquement significatives est quasi impossible.

En 2014, un consortium de laboratoires a généré un nouveau modèle animal de la DMD : le rat DMDmdx. Cette lignée de rat, qui a été totalement caractérisée, se révèle être un très bon reflet de la pathologie humaine (atteintes supérieures à celles observées chez la souris mdx, comparables voire meilleures et plus reproductibles que celles observées chez le chien GRMD). Le rat, qui est 10x plus gros que la souris, reste malgré tout un modèle de petit animal de laboratoire bien connu et qui ne présente pas les limitations du modèle canin. Ce modèle animal - le rat DMDmdx - peut donc se substituer au modèle canin, au moins pour réaliser les 1ères phases d'évaluation de l'efficacité de nouveaux produits thérapeutiques.

Notre équipe développe un ensemble d'approches expérimentales afin d'évaluer l'efficacité de produits pharmacologiques pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire. Ainsi, sur ce modèle de rat DMDmdx, nous envisageons de tester 10 produits en 5 ans.

Pour chaque composé testé, des rats DMDmdx seront traités pendant une durée définie en fonction du composé et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par voie orale via l'eau de boisson ou l'alimentation, ou par injection intrapéritonéale. Les animaux seront répartis en maximum 5 groupes, selon le nombre de molécules ou doses à tester et les groupes référents nécessaires, avec un effectif de 15 animaux par groupe. Ce nombre de 15 animaux par groupe est basé sur notre expérience de protocoles de thérapie pharmacologique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles avec ces effectifs. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis.

Un ensemble de paramètres sera évalué pour l'étude des effets des composés sur le comportement général et la fonction motrice des animaux. Ainsi, le poids des animaux, leur consommation alimentaire et hydrique seront évalués. La force d'agrippement, les capacités de déplacement, les caractéristiques de marche, l'anxiété des animaux, les mémoires et les fonction neuromotrices seront également analysés avant, au cours et à la fin du traitement. Cette répétition de mesures non invasives permettra ainsi de suivre de régulièrement 1) l'état des animaux 2) les effets des traitements sur chaque animal. Des prélèvements sanguins exhaustifs seront également réalisés afin de réaliser des dosages hématologiques et biochimiques et préparer des sérums pour les analyses des marqueurs circulants de la maladie. Cette approche *in vivo* sera également complétée par des techniques *in vitro* d'analyse de la fonction

musculaire en vue d'identifier les cibles d'action des composés. Pour cela, en fin de traitement les animaux seront euthanasiés, plusieurs muscles et organes seront prélevés et pesés, et les propriétés contractiles de faisceaux cellulaires isolés des certains muscles seront analysés.

Ces approches permettront de mettre en évidence au niveau pré-clinique les effets musculaires de composés d'intérêt sur le modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne. Au total, sur une période de 5 ans, 750 animaux seront utilisés. L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

Remplacer

Ce projet conduit chez le rat DMDmdx permettra de valider l'évaluation préclinique d'approches thérapeutiques de la DMD dans un modèle animal adapté. Ainsi, l'objectif est de réduire voire remplacer le chien GRMD pour cette évaluation préclinique.

Réduire

Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en tenant compte de la validité statistique, des contraintes des modèles et des approches expérimentales.

Raffiner

Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu.

L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entraîner un déclin de l'état de santé (difficultés locomotrices, d'alimentation voire respiratoires), l'état général des animaux sera surveillée de façon quotidienne par le personnel animalier et responsable du projet pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie.

Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie.

L'ensemble des tests d'évaluation, validés et non invasifs, sera effectué sur animal vigile.

6361. Dans le cadre de la mise en place de nouveaux traitements thérapeutiques pour lutter contre les cancers, l'immunothérapie est une voie prometteuse. L'immunothérapie adoptive vise à administrer à un patient des effecteurs immunitaires reconnaissant spécifiquement les cellules tumorales à éliminer. L'objectif de ce projet est d'obtenir des preuves de concept (faisabilité, efficacité) dans un modèle animal pouvant justifier l'exploitation d'une immunothérapie adoptive en association au traitement standard (chimiothérapie) dans le traitement des cancers de l'ovaire et de tenter de trouver la meilleure combinaison thérapeutique possible. Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle non-animal, car nous avons besoin d'un organisme intégré.

Des souris immunodéficientes NOD-SCID-IL-2R $\gamma$  [NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, NSG] seront utilisées comme modèle animal de développement de tumeurs ovariennes humaines par greffe de cellules tumorales. Ces souris recevront par la suite une administration locale et/ou intraveineuse d'effecteurs lymphocytaires T d'origine humaine ainsi que de chimiothérapie mimant le traitement de standard des patientes. Les populations polyclonales de lymphocytes T utilisées seront des effecteurs pouvant réagir spécifiquement contre les cellules tumorales préalablement décrite pour avoir un fort potentiel thérapeutique. Les agents chimiothérapeutiques utilisés seront ceux déjà utilisés dans le traitement des patientes (grade GMP), seul ou en combinaison, et administrés selon différents protocoles inspirés de ceux utilisés en clinique et/ou issus de la littérature.

Globalement, ce projet devrait nécessiter l'utilisation de maximum 720 souris (en fonction du nombre de combinaison thérapeutiques testés dans différents modèles). Pour limiter le nombre d'animaux, différentes étapes seront réalisées successivement, afin de définir à chaque fois les meilleures conditions expérimentales.

- Développement de 5 à 10 modèles de tumeurs ovariennes humaines (variable en fonction du mode d'injection, des caractéristiques de croissance, de l'apparition de carcinose intrapéritonéale). Chaque modèle nécessitera l'utilisation de 42 animaux.

- Vérification de la non toxicité et de l'efficacité de différentes molécules de chimiothérapie en fonction de la voie d'administration (intraveineuse, intrapéritonéale) et de leur association. Tous les protocoles testés seront issus de la littérature et déjà décrit comme non toxique (dose maximale toléré) et efficace. Il est envisagé de tester 4 molécules, selon différentes combinaisons, ce qui nécessitera l'utilisation de 8 lots de 5 animaux par voie d'injection.

- Évaluation du bénéfice thérapeutique de l'administration de différents effecteurs lymphocytaires T humains en fonction des modalités d'association (nombre et moment des injections) avec les différents protocoles de chimiothérapie. Cette étape concernera 42 souris par effecteurs testés et pour chaque protocole de chimiothérapie.

- Confirmation de l'intérêt thérapeutique de la combinaison thérapeutique sur 2 à 3 modèles de tumeur ovarienne humaine. Si les résultats obtenus précédemment sur le modèle de référence présentent un bénéfice en termes de survie après association des deux traitements, ce protocole sera alors testé sur d'autres modèles de xénogreffes de cellules tumorales. Pour chaque modèle nous utiliserons 28 souris (lots contrôle, lot chimiothérapie seule, lot immunothérapie seule et test en conditions optimales).

Nous utiliserons des lots de 7 souris et nous analyserons les résultats par tests statistiques de comparaison : test du log-rank. D'un point de vue statistique, l'utilisation de plus d'animaux par lot semble préférable, nous sommes éthiquement amenés à tenter de réduire le nombre d'animaux utilisés. Plusieurs études publiées dans notre domaine de recherche, utilisant des modèles animaux similaires décrivent l'utilisation de 7 animaux par lot.

Afin de prévenir au maximum de la souffrance de l'animal, les souris seront suivies quotidiennement. Ainsi, au moindre signe anormal (perte de 10% du poids, attitude prostrée, poils hérissés, etc..) les souris seront euthanasiées.

6362. Le projet consiste à tester l'efficacité vaccinale des réponses immunitaires induites sur la croissance tumorale. L'objectif du projet est de définir des formules moléculaires, administrables à un individu en vue d'éliciter des réponses immunitaires conférant une protection contre les tumeurs cancéreuses.

Le projet "Vecteur Lipidique Vaccin anti-Tumoral" est conçu en tenant compte des directives Européennes (voir Official Journal of the European Union L 276/33). : « Reduce, Refine, Replace ». Les formules moléculaires vaccinales seront analysées par une série d'essais sur cellules en culture afin d'évaluer leurs effets toxiques potentiellement délétères pour les animaux. Cette phase « *in vitro* » permet de remplacer l'évaluation de la toxicité sur animal. Au cours du projet, plusieurs options de voies d'immunisations seront étudiées; une première série d'animaux sera étudiée afin de sélectionner la meilleure voie qui sera retenue pour la suite du projet. Cette disposition permettra de réduire le nombre d'individus inclus dans l'expérimentation animale. Afin de raffiner l'utilisation des animaux, ceux-ci seront observés 3 fois par semaines pour s'assurer de leur bonne santé et vitalité; les animaux montrant des signes de stress et de souffrance seront exclus de l'étude et seront euthanasiés.

Le nombre total maximal d'animaux est de 600.

En l'état actuel des connaissances technologiques, il n'est pas possible de réaliser ce type d'expérience totalement *in vitro* notamment en ce qui concerne l'induction de réponse immunitaire et l'évaluation de son efficacité contre les tumeurs cancéreuses.

Les résultats du projet fourniront la définition de formules vaccinales, plus sûres et plus efficaces, qui seront ensuite développées pour la vaccination animale (animaux de compagnies et bétails) et humaine.

6363. Afin d'améliorer la qualité des vaccins de nouvelle génération, il est essentiel de comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans leur efficacité. Les vecteurs lentiviraux sont des candidats prometteurs dans le développement de nouveaux vaccins prophylactiques et thérapeutiques car il a été montré que ces vecteurs induisent de fortes réponses immunitaires protectrices. L'étude de leur efficacité au niveau des phases précoces de la réponse immunitaire est essentielle pour comprendre les mécanismes de l'induction de ces réponses qui permettront d'améliorer les performances de futurs vaccins. Le but de ce projet est de caractériser le rôle des cellules dendritiques plasmacytoides (pDC) et conventionnelles (cDC), lors de l'induction d'une réponse immunitaire suite à une vaccination basée sur l'utilisation de vecteurs lentiviraux.

Dans le cadre de cette étude, des essais sur des modèles murins génétiquement modifiés ou non sont nécessaires afin de pouvoir déterminer les facteurs indispensables à l'induction d'une réponse immunitaire efficace protectrice à long terme en présence ou en absence de pDC ou cDC dans des conditions physiologiques. Nous avons défini le nombre nécessaire et suffisant d'animaux à 3400 souris. Elles seront utilisées pour ce projet englobant 5 procédures expérimentales (3 de classe légère et 2 de classe modérée). Ce nombre est adapté pour atteindre l'objectif du projet avec des résultats statistiquement acceptables permettant d'apporter des réponses définitives aux questions posées dans ce projet. Les protocoles sont établis afin de minimiser la souffrance animale en adoptant des procédures éthiquement approuvées.

Ces essais auront pour finalité le développement de vaccins plus efficaces et plus sûrs dans le traitement de nombreuses pathologies humaines.

6364. Les cellules souches du cancer (CSC), identifiées dans la plupart des cancers, sont impliquées dans le développement de métastases, la résistance aux traitements et les récives après traitement. Les recherches visant à éliminer les CSC représentent donc un enjeu de première importance d'un point de vue de santé publique. Pour éliminer les CSC, il faut dans un premier temps pouvoir les identifier. Cependant il n'existe à ce jour aucun marqueur cellulaire permettant une identification simple et rapide des CSC *in vitro*. En effet, la seule technique de référence actuelle pour confirmer la présence de CSC dans une population cellulaire est l'injection sous cutanée de cette population dans des souris immunodéficientes. L'observation consécutive d'un développement tumoral permet alors d'affirmer que la population cellulaire injectée contient des CSC. Notre équipe s'intéresse à l'influence du microenvironnement tumoral sur le comportement des CSC rénales. Pour mener à bien notre projet, nous avons mis au point une méthode de purification des CSC basée sur l'expression de nouveaux marqueurs moléculaires. Le recours à l'expérimentation animale reste cependant l'ultime étape indispensable pour valider notre technique purification. Nous disposons de 10 populations de cellules cancéreuses rénales issues de la biopsie de 10 patients. Pour valider le caractère souche des cellules purifiées, les tumeurs issues des injections seront dissociées puis les cellules seront à leur tour injectées selon le même protocole à de nouvelles souris, ce qui nécessite l'utilisation de 200 souris.

Règle des 3Rs

1/ Réduire le nombre d'animaux : Un nombre minimum d'animaux est nécessaire dans chaque lot afin de pouvoir valider les résultats de façon statistique. Nous récupérerons un maximum de données sur une même souris. Cette méthode nous permettra de réduire le plus possible le nombre de souris utilisées, tout en préservant la qualité de la recherche menée.

2/ Remplacer les animaux : Pour des raisons scientifiques et éthiques, nous répondrons au plus grand nombre de questions à l'aide d'expériences réalisées *in vitro*. Une fois que toutes les expériences préliminaires sans animaux seront terminées, le recours à l'expérimentation animale sera indispensable pour valider nos résultats. Le nombre



minimum suffisant de souris sera utilisé pour répondre à notre question scientifique. Après validation par l'expérimentation animale, nous pourrions remplacer au laboratoire l'utilisation des souris par notre technique de purification des CSC *in vitro*.

3/ Raffiner les méthodes : Les souris seront hébergées en petits groupes pour réduire le stress, avec eau et nourriture à volonté. Les cages seront placées dans un isolateur stérile qui les protège de toute infection. Lors de l'injection des cellules cancéreuses, les souris seront anesthésiées puis remises en groupes pour le réveil (durée de l'intervention : quelques minutes). Chaque souris ne subira qu'une seule injection au cours de sa vie. Le développement tumoral est observé tous les 2 à 3 jours et les souris seront euthanasiées par une méthode rapide générant le moins de douleur possible dès qu'un signe de douleur, angoisse, souffrance est détecté. Si aucun signe n'est détecté, c'est le diamètre de la tumeur qui conditionne le sacrifice.

6365. Le lait est produit dans la glande mammaire par les cellules épithéliales mammaires. La production laitière d'une vache est déterminée par l'activité et le nombre de ces cellules. Le nombre dépend de la proportion de cellules en mort cellulaire ou en multiplication. Certaines cellules peuvent aussi être évacuées dans le lait. La photopériode (= la durée du jour) est connue pour influencer la production laitière chez les vaches laitières. L'augmentation de la durée du jour est associée à une augmentation de la production laitière et à des concentrations plus élevées d'une hormone impliquée dans la régulation de la production laitière : la prolactine. La perte de cellules dans le lait est aussi influencée par la durée du jour : des vaches exposées à des jours courts perdent plus de cellules dans le lait que des vaches exposées à des jours longs. L'effet de la durée du jour sur la perte de cellules dans le lait pourrait s'expliquer par une baisse des taux de prolactine. En effet, la prolactine est déjà connue pour limiter la perte de cellules dans le lait.

À travers ce projet, nous voulons comprendre le rôle de la prolactine dans l'effet de la photopériode sur l'exfoliation des cellules épithéliales mammaires dans le lait chez la vache laitière. Pour répondre à cet objectif, 8 vaches laitières seront soumises à deux traitements lumineux à l'aide de lampes (jours courts = 8h de lumière/jour ou jours longs = 16h de lumière/jour) et deux traitements visant ou non à inhiber la sécrétion de la prolactine (injection d'une molécule inhibant la sécrétion de prolactine ou injection d'eau). La perte de cellules dans le lait sera étudiée par une méthode innovante et non invasive de purification de ces cellules à l'aide d'un anticorps spécifique couplé à des billes magnétiques. À partir de ces cellules du lait, nous étudierons aussi le fonctionnement de la glande mammaire de manière non invasive.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier la perte de cellules dans le lait de vache.

Réduire : Le schéma expérimental en carré latin et le traitement statistique des données permettront de répondre aux objectifs scientifiques tout en limitant le nombre d'animaux.

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse du bien-être des animaux et un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Les prélèvements d'échantillons seront accompagnés d'une anesthésie et/ou d'une analgésie si besoin et des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter ou d'atténuer au maximum toute forme de souffrance potentielle des animaux. De plus, la méthode choisie pour étudier le fonctionnement de la glande mammaire est une méthode non invasive.

6366. Le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent dans le monde et en France où il touche environ 40 000 personnes par an et représente la première cause de décès par cancer due en partie à une résistance innée ou acquise de ces tumeurs aux traitements anti-cancéreux.

L'un des grands mécanismes de résistance aux thérapies est la présence de cellules souches cancéreuses (CSCs). Comme les CSCs sont hautement tumorigènes et résistantes aux thérapies conventionnelles, leur élimination spécifique représente l'un des plus importants enjeux de la recherche contre le cancer. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le maintien des propriétés souches des CSCs permettrait de cibler spécifiquement ces cellules en révélant de nouvelles cibles thérapeutiques. L'une des caractéristiques communes entre les cellules souches et les CSCs est leur interaction avec un microenvironnement spécifique ou « niche » permettant leur régulation entre quiescence et prolifération cellulaire. En fonction du microenvironnement, les cellules souches et les CSCs peuvent adapter leur métabolisme, changeant ainsi la production d'énergie selon leur besoin et la disponibilité des nutriments présents. Cependant les mécanismes impliqués dans cette adaptation ne sont pas encore bien élucidés. Mon hypothèse de travail est que CD98hc joue un rôle majeur dans l'initiation des cancers pulmonaires en permettant non seulement une interaction avec le microenvironnement via son rôle de régulateur des intégrines mais également une adaptation en fonction de ce microenvironnement via son rôle de protéine chaperonne de transport d'acides aminés.

Ainsi, la caractérisation des cellules souches cancéreuses et l'analyse du rôle de CD98hc dans ce contexte nous permettraient à long terme de développer des stratégies thérapeutiques nouvelles. Néanmoins, nos connaissances actuelles s'appuient principalement sur des résultats obtenus *in vitro* à l'aide de lignées cellulaires. Malgré l'utilité de ces systèmes, ils ne permettent cependant pas de récapituler la complexité et l'hétérogénéité des tumeurs. C'est pourquoi l'utilisation de tumeurs dérivées de patients est un prérequis dans la compréhension du rôle de CD98hc dans l'initiation tumorale. Pour cela, nous utiliserons un modèle de greffes de tumeur humaine sur des souris immunodéprimées par implantation des tumeurs humaines non dissociées. En effet, ce modèle de greffe permet d'aborder toute la complexité des tumeurs humaines et des interactions avec son environnement. Pour les besoins de

l'étude, les souris seront implantées avec des tumeurs issues de biopsies humaines fraîchement isolées (résection chirurgicale).

La caractérisation du rôle de CD98hc dans le phénotype souche des CSCs se fera en comparant l'initiation tumorale des populations cellulaires : CD98hc- et CD98hc+. Les tumeurs dérivées de patients préalablement implantées dans des souris seront collectées, digérées, et les cellules humaines seront isolées par cytométrie selon les marqueurs adéquats afin d'exclure les cellules endothéliales et hématopoïétiques humaines et murines (CD98hc, CD45 et h2kd). Les cellules isolées seront ensuite soit cultivées *in vitro* dans des tests d'auto-renouvellement cellulaire permettant de quantifier l'enrichissement de CSCs qui peuvent se diviser à l'identique à l'infini, soit réimplantées en dilution limite dans des souris afin de quantifier leur capacité tumorale. Une seule CSC sera capable de former une tumeur hétérogène comportant non seulement des cellules souches mais également des cellules différenciées (grâce notamment à leur capacité de division asymétrique). L'index d'initiation tumorale sera ensuite calculé selon la méthode ELDA. Le rôle de CD98hc dans la récapitulation de l'hétérogénéité tumorale sera étudié en comparant les tumeurs obtenues aux tumeurs primaires (structure/type, nombre de cellules CD98hc+ et -). Afin d'étudier plus spécifiquement le rôle fonctionnel de CD98hc dans les propriétés des CSCs, les cellules CD98hc+ isolées seront délétées de CD98hc par l'utilisation de vecteurs lentiviraux exprimant shCD98hc. Les résultats obtenus me permettront de mieux comprendre l'implication de CD98hc dans l'émergence tumorale.

Cette étude permettra de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de patients atteints de carcinomes agressif que sont les carcinomes pulmonaires. Pour répondre aux exigences des 3R, le suivi des animaux sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller objectivement l'état des animaux (Raffinement). Les souris seront sacrifiées selon les procédures décrites soit 60 jours après implantation ou lorsque le point limite sera atteint. Ce point limite est défini par un volume tumoral de 1 cm<sup>3</sup> atteint, une ulcération de la tumeur ou toute tumeur pouvant interférer avec l'activité de l'animal (toiletage, gêne pour se mouvoir, se nourrir...). Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir du nombre minimum d'animaux (Réduction). Aussi souvent que possible, les expériences ont été et seront réalisées *in vitro* sur des cellules en culture (Remplacement). Cependant, la complexité d'une tumeur, de par la présence de nombreux types cellulaires de différentes origines, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Les expériences seront effectuées en limitant le niveau de stress des animaux, en particulier, en limitant au maximum les animaux isolés pendant l'expérimentation et un soin particulier sera apporté à l'enrichissement de l'environnement. Le nombre total d'animaux impliqués dans ce projet est 400.

6367. L'excès de tissu adipeux est suspecté être à l'origine des complications associées à l'obésité dont la résistance à l'action de l'insuline qui peut ensuite évoluer en diabète. Une protéine a été identifiée dans le tissu adipeux dont l'expression est inversement proportionnelle à la taille des adipocytes. Elle a jusqu'à présent été essentiellement étudiée dans le foie. Par des approches de mesure d'expression génique, chez l'Homme et dans plusieurs cohortes, l'expression du gène codant pour cette protéine a été montrée fortement liée à la sensibilité à l'insuline. Les effets d'une surexpression de cette protéine spécifiquement dans le tissu adipeux seront étudiés *in vivo* afin de tester si une forte expression dans ce tissu, comme c'est le cas dans le tissu adipeux d'individus minces et non diabétiques, peut protéger du développement d'une résistance à l'action de l'insuline. Pour répondre à la question essentielle de la contribution de la protéine issue du tissu adipeux à la sensibilité à l'insuline locale et systémique, comparativement à celle provenant du foie, les études *in vitro* ne suffisent pas. Seuls les modèles animaux peuvent répondre à ces questions de physiologie intégrée. Les investigations seront menées en accord avec la règle des 3R: des groupes de 10 souris mâles par condition expérimentale sont suffisants pour estimer l'importance de notre protéine d'intérêt dans la protection contre la dégradation de la sensibilité à l'insuline. Au total 60 souris réparties en 3 groupes seront utilisées. Les souris seront hébergées dans une structure répondant aux exigences légales et ayant obtenu l'agrément. Un enrichissement sera apporté dans chacune des cages (feuilles essuie-tout). Si nécessaire, des tubes ou igloos pourront être ajoutés. La nourriture et la boisson seront mises à disposition à volonté. Un technicien de la structure passera tous les jours (week-end et jours fériés inclus) pour vérifier les souris, les mangeoires et les biberons. Les autres points limites décidés pour ce programme sont la prostration, l'absence de toilette, la déshydratation.

6368. - Mots-clés: Etudes d'efficacité, antiparasitaires, infestation, ectoparasites, endoparasites, espèces cibles

- Raison du projet: Les parasites sont des êtres vivants (animaux, végétaux ou fongiques) se développant aux dépens d'un autre être vivant, appelé l'hôte. Les parasites ont une importance médicale, une importance économique, et parfois même une importance en santé publique. Certains parasites peuvent avoir des conséquences graves pour la santé, voire causer la mort des animaux infestés. Dans le cadre de gestion du risque parasitaire, ou en cas d'infestation établie, il est important de pouvoir traiter les animaux avec des produits antiparasitaires efficaces afin d'améliorer le bien-être des animaux et de limiter les pertes économiques.

- Objectifs: Parmi les parasites problématiques chez les animaux de rentes, on distingue les parasites externes (poux, puces, gales, teignes, tiques, mouches...) et les parasites internes (helminthes, protozoaires...). Le projet vise à évaluer l'efficacité de produits antiparasitaires dans des modèles d'infestations naturelles et/ou artificielles par des parasites

internes (ou endoparasites) ou externes (ou ectoparasites) chez l'espèce cible (bovins, ovins, caprins, porcins, volailles ou lapins).

Afin d'obtenir une autorisation de mise sur le marché, l'efficacité des produits antiparasitaires doit être validée sur chaque espèce de parasites et chez chaque espèce cible.

Bénéfice attendu du projet : Ce projet inclut le développement et la caractérisation de modèles expérimentaux d'infestations parasitaires, les études non-réglementaires (études de développement de produits, proof-of-concept), ainsi que la réalisation d'études réglementaires nécessaires au dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires (études de détermination de doses ou de confirmation de dose par exemple).

- Animaux : espèces cibles du produit à tester (bovins, ovins, caprins, porcins, volailles ou lapins). L'âge des animaux correspondra si possible à l'épidémiologie de la pathologie sur le terrain. Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat. Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. Généralement, s'agissant d'études comparatives, 2 à 5 groupes seront constitués, le nombre d'animaux par groupe sera de l'ordre de 6 à 20, soit un effectif maximum de 100 animaux par étude. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 2, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 1000 animaux maximum sur la période de 5 ans.

- Dommages attendus : Dans le cas des endoparasites, la souffrance attendue est modérée ou sévère en fonction du type de parasites et des signes cliniques associés (pneumonies, diarrhées, anorexie, amaigrissement...). Dans le cas des parasites externes la souffrance attendue est modérée et correspond à la nuisance induite par la présence du parasite sur l'animal (agacement, démangeaisons, lésions cutanées, dermatose...) et aux signes cliniques (prurit, anémies...). La durée des modèles varie de quelques jours à plusieurs semaines en fonction de la durée du cycle du parasite. Les points limites sont donc adaptés aux différents types d'infestation parasitaires. En cas de dépassement des points limites, les animaux seront euthanasiés pour raison éthique selon les méthodes définies en annexe IV de l'arrêté du 1er février 2013. Pour les groupes contrôles négatifs (non traités, placebo), ou en cas d'inefficacité des produits d'étude, un traitement curatif d'efficacité connue pourra être administré à l'issue de l'étude afin d'assainir les animaux avant qu'ils soient remis dans le circuit (lorsque cela est compatible avec l'étude).

- Application des 3Rs :

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

. Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

. Raffinement : Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux. Le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux (animaliers et vétérinaires)

6369. Les dispositifs médicaux (DM) doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin d'évaluer leur biocompatibilité selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. Ce projet décrit ici et défini dans la norme ISO 10993-11, l'USP 151 et la Pharmacopée européenne a pour objectif la protection des êtres humains contre les risques biologiques potentiels de l'utilisation de DM et en particulier les risques concernant la pyrogénicité.

La pyrogénicité est la capacité d'un agent chimique ou d'une autre substance à produire une réponse fébrile. Les réponses pyrogènes peuvent être médiées par des substances, induites par des endotoxines ou véhiculées par d'autres substances, telles que des composants de bactéries Gram-positifs et de champignons. La présente partie de l'ISO 10993 concerne la pyrogénicité médiée par les matériaux.

Il n'est pas nécessaire de tester tous les nouveaux dispositifs médicaux pour la pyrogénicité *in vivo*. Cependant, les matériaux contenant de nouvelles entités ou substances chimiques devraient être évalués pour la pyrogénicité médiée par le matériau. La contamination par les endotoxines peut être une source de réponse pyrogène, et ne doit pas être confondu avec une réponse pyrogénique médiée par le matériau.

Cette forme de pyrogénicité provenant de l'endotoxine biologiquement active des bactéries gram-négatives, qui est habituellement une contamination dans le processus de fabrication des dispositifs médicaux induisant la fièvre, est évaluée par la mesure de la quantité d'endotoxine dans les dispositifs par un test *in vitro*, dit test LAL spécifique à l'endotoxine (Amebocyte de Limulus Lysate) sans effectuer de test chez le lapin.

La pyrogénicité médiée par le matériau provient de facteurs non liés aux endotoxines et ne peut pas être évaluée par un test *in vitro*. Le test pyrogène chez le lapin est donc actuellement recommandé. La méthode pour effectuer le test pyrogène chez le lapin être décrite dans la pharmacopée (chapitre 151) et la Pharmacopée européenne (partie 2.6.8). Le test LAL ne convient pas pour déterminer la pyrogénicité de ces substances. Nous utiliserons 20 animaux pour ce projet.

Remarque sur le remplacement : il existe une autre méthode *in vitro* basée sur la libération de cytokines par les monocytes / macrophages pour détecter la pyrogénicité liée aux composants de bactéries et de champignons Gram négatif et Gram positif (dit test MAT). Ce test n'est pas non plus validé pour la pyrogénicité médiée par le matériau.

Avant d'initier tout test de pyrogénicité chez l'animal, le test *in vitro* LAL sera réalisé afin de s'assurer de l'absence de pyrogénicité lié à une contamination du DM par des endotoxines. Une fois cette vérification faite, l'éventuelle pyrogénicité induite par le matériel lui-même sera vérifiée *in vivo*.

Par ailleurs, les points limites suivants ont été définis et conduisent à une décision d'euthanasier l'animal pour éviter toutes souffrances inutiles : présence de sang dans les urines, paralysie ou convulsion ou hémorragie ou cyanose, vocalisations en absence de contention, tremblements associé à un des autres critères ou seul mais perdurant dans le temps.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 20 (adultes, tel que défini dans la norme). Ils disposent d'un enrichissement de leur environnement (briques en bois).

Le principe de l'étude décrite dans ce projet est d'administrer par voie intraveineuse le dispositif (ou un extrait polaire du dispositif) puis de mesurer la température corporelle des animaux à des temps déterminés par les normes (pour un maximum de 3 heures après injection). Si la température des animaux dépasse le seuil déterminé par la norme, le dispositif est considéré comme étant pyrogène.

Les protocoles expérimentaux définis par les normes USP et par la Pharmacopée européenne sont basés sur les mêmes principes généraux mais diffèrent légèrement dans leur procédure (par exemple au niveau des temps de mesure, du nombre d'animaux traités et des seuils fixés pour la pyrogénicité). Le choix du protocole à suivre dépendra de l'instance réglementaire auprès de laquelle l'enregistrement du dispositif devra être fait.

Pour le test selon la norme USP, trois animaux sont traités dans un premier temps. Le test n'est complété que si nécessaire, 3 animaux par 3 animaux avec analyse de résultats après chaque étape pour décider si les résultats obtenus sont suffisants pour obtenir une conclusion ou s'il faut poursuivre le test. L'étude implique au final un maximum de 4 groupes de 3 animaux.

Pour le test selon la Pharmacopée européenne, trois animaux sont traités dans un premier temps. Le test n'est complété que si nécessaire avec 5 animaux supplémentaires.

6370. Les dispositifs médicaux (DM) doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin d'évaluer leur biocompatibilité sur animaux vivants selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. Ce projet décrit ici et défini dans la norme ISO 10993-10 a pour objectif la protection des êtres humains contre les risques biologiques potentiels de l'utilisation de DM et en particulier les risques concernant l'irritation.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 72 (jeunes adultes, tel que défini dans la norme). Ils disposent d'un enrichissement de leur environnement (tunnels en carton pour rongeurs, briques en bois pour lapins).

Les études présentées dans ce projet ont toutes pour but l'évaluation de la tolérance locale d'un DM. Les protocoles diffèrent pour pouvoir s'adapter au type de DM à évaluer, principalement au niveau du site de traitement mais également en fonction de la nature du DM et de son mode d'application chez le patient (dose, nombre d'applications, durée du traitement, méthode d'application). Le choix de l'étude et son design en termes de traitements à effectuer dépend donc du dispositif à évaluer. L'exposition doit être au moins égale à celle chez le patient, de manière à évaluer correctement le risque.

Pour l'ensemble de ces études, tout matériau irritant pour la peau, les yeux ou les muqueuses ou ayant un  $\text{pH} \geq 2,0$  ou  $\leq 11,5$  ne doit pas être testé et doit être étiqueté comme irritant potentiel. Dans des cas exceptionnels où une caractérisation / évaluation des risques est nécessaire malgré cela, ces cas doivent être justifiés et documentés.

Par ailleurs, les tests d'irritation ne doivent être envisagés que si les données de sécurité ne peuvent être obtenues par d'autres moyens. Il existe des modèles *in vitro* d'irritation cutanée (OCDE 431 et OCDE 439) qu'il est possible d'utiliser sous réserve de pouvoir travailler sur le dispositif tel quel. L'irritation oculaire peut être évaluée par des tests *in vitro* (OCDE 438 et OCDE 439) mais ces tests ne permettent que d'identifier les produits ayant des effets sévères et ne sont donc pas adaptés à la plupart des DM. De manière générale, ces tests *in vitro* ne sont pas aussi fiables que les tests *in vivo* mais pourront principalement servir de screening avant confirmation par des tests chez l'animal.

Dans les études pour lesquelles l'évaluation de l'irritation n'est pas dépendante de l'analyse histologique mais uniquement des observations macroscopiques, il faut envisager de tester d'abord un animal. Si une réponse clairement irritante est observée, le test peut être arrêté. Dans le cas contraire, au moins deux animaux supplémentaires doivent être utilisés. Si la réponse à l'essai en utilisant le minimum de trois animaux est équivoque, d'autres tests doivent être envisagés.

Par ailleurs, les points limites suivants ont été définis et conduisent à une décision d'euthanasier l'animal pour éviter toutes souffrances inutiles : lapin : perte de poids  $\geq 20\%$  sur 72 heures ou perte de poids moins importante mais perdurant dans le temps, animal ne buvant plus et/ou ne mangeant plus, présence de sang dans les urines, paralysie ou convulsion ou hémorragie ou cyanose, vocalisations en absence de contention, tremblements associé à un des autres critères ou seul mais perdurant dans le temps ; rongeurs, en plus des critères précédents : pertes d'équilibre persistantes, animal tournant en rond, diarrhée perdurant sur plus de 48 heures.

Ce projet comprend les études suivantes :

- Etude d'irritation cutanée: étude chez le lapin.
- Etude de tolérance intradermique: étude sur lapin.
- Etude d'irritation oculaire: étude chez le lapin.
- Etude d'irritation de la muqueuse buccale ou pénienne ou nasale: étude chez le hamster ou le cobaye ou le rat, respectivement.

- Etude d'irritation rectale ou vaginale: étude réalisée chez le lapin.

6371. Les dispositifs médicaux doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité sur animaux vivants afin d'évaluer leur biocompatibilité selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. Ce projet décrit ici et définit dans la norme ISO 10993-10 a pour objectif la protection des êtres humains contre les risques biologiques potentiels de l'utilisation de dispositifs médicaux (DM) et en particulier les risques concernant l'irritation (tolérance locale) et la sensibilisation (réactions allergiques). Ce projet concerne les tests pour l'évaluation de la sensibilisation.

La présente partie de l'ISO 10993 est basée sur de nombreuses normes et directives, y compris les lignes directrices de l'OCDE, la Pharmacopée américaine et la Pharmacopée européenne. Il est destiné à être le document de base pour la sélection et la réalisation de tests permettant d'évaluer les réactions de sensibilisation cutanée afin d'assurer la sécurité des matériaux et dispositifs médicaux.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 69.

Ce projet est constitué des études suivantes:

- Evaluation de la sensibilisation par le test de Magnusson et Kligman (GPMT), dit de maximalisation (avec utilisation d'un adjuvant). Cette étude est réalisée chez le cobaye (animaux pour l'étude + animaux pour les essais préliminaires sur le véhicule et la nécessité d'une extraction).

Ce test est adapté à la grande majorité des DM et est donc le test de préférence pour l'évaluation de la sensibilisation. Il consiste en une phase d'induction (mise en contact avec le DM) et une phase dite de challenge permettant d'évaluer l'éventuelle apparition de réactions cutanées (érythèmes accompagnés ou non d'œdèmes), signes d'une réaction de sensibilisation. Cette méthode est une méthode sensible pour l'évaluation de la sensibilisation car elle implique pendant la phase d'induction, une injection intradermique du DM en association avec l'injection d'un adjuvant permettant de stimuler la réponse immunitaire et d'une application topique associée à l'application d'un produit irritant. C'est la raison pour laquelle ce test est dit "de maximalisation".

Il peut être nécessaire, selon les résultats obtenus, de réaliser un second challenge sur les mêmes animaux. Si les résultats de ce second challenge restent équivoques, il peut être nécessaire de compléter le test.

Par ailleurs, la norme indique qu'il est nécessaire de vérifier la sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale régulièrement en utilisant une substance dont le pouvoir sensibilisant est connu pour être léger à modéré.

- Evaluation de la sensibilisation par le test de Buehler dans lequel le produit à étudier n'est appliqué que par contact cutané. Etudes réalisées chez le cobaye (étude et essais préliminaires).

Ce test n'est adapté que pour les DM n'ayant qu'un contact avec une peau intacte. Il consiste en une phase d'induction (mise en contact avec le DM par application topique 3 fois par semaine pendant 3 semaines consécutives) et une phase dite de challenge permettant d'évaluer l'éventuelle apparition de réactions cutanées (érythèmes accompagnés ou non d'œdèmes), signes d'une réaction de sensibilisation.

Il peut être nécessaire, selon les résultats obtenus, de réaliser un second challenge sur les mêmes animaux. Si les résultats de ce second challenge restent équivoques, il peut être nécessaire de compléter le test avec de nouveaux animaux.

Par ailleurs, la norme indique qu'il est nécessaire de vérifier la sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale régulièrement en utilisant une substance dont le pouvoir sensibilisant est connu pour être léger à modéré (test réalisé au sein de notre laboratoire tous les 6 mois sur 15 animaux).

- Evaluation de la sensibilisation par le test LLNA (Local Lymph Node Assay). Ces études sont réalisées chez la souris : 1 souris pour les essais préliminaires qui permettent de déterminer la dose maximale non toxique et non irritante qui sera utilisée dans le test principal. Il peut être nécessaire de tester plusieurs doses en essai préliminaire ; 20 souris pour le test principal soit 1 lot contrôle et 3 doses du produit à étudier).

Cette méthode constitue une méthode de remplacement aux tests réalisés chez le cobaye mais elle est limitée aux DM pouvant être solubilisés dans un véhicule pour administration. La méthode LLNA, mise en œuvre *in vivo*, ne met donc pas un terme à l'utilisation d'animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Elle est néanmoins susceptible de réduire le nombre d'animaux requis à ces fins. En outre, le LLNA propose un raffinement important (réduction du stress et de la douleur) de l'utilisation des animaux pour évaluer la sensibilisation allergique par contact. Après traitement topique d'un échantillon test sur la face dorsale des oreilles, l'étendue de la prolifération lymphocytaire est mesurée dans les ganglions lymphatiques qui drainent les sites d'application (oreilles). Avec la méthode d'évaluation de la prolifération cellulaire utilisée (incorporation de BrdU), une réponse de la prolifération cellulaire supérieure ou égale à 1.6 par rapport à l'activité des contrôles est le seuil de désignation d'un matériau d'essai en tant que sensibilisateur.

Par ailleurs, la norme indique qu'il est nécessaire de vérifier la sensibilité et la fiabilité de la technique expérimentale régulièrement en utilisant une substance dont le pouvoir sensibilisant est connu pour être léger à modéré.

6372. Ce TP concerne des étudiants de première année après le BAC dans le cadre des enseignements de physiologie animale. Ces étudiants sont destinés à la profession de technicien et doivent être à même de trouver un emploi dans des instituts de recherche publique ou dans des structures privées, par exemple dans le domaine de la pharmacologie. Ils peuvent donc être amenés, au cours de leur carrière, à travailler sur des animaux vivants. Les professionnels

susceptibles de les recruter souhaitent que ces étudiants soient bien formés aux techniques utilisées en expérimentation animale.

Au cours de ce TP, les étudiants réaliseront deux techniques chirurgicales de base (l'intubation de la trachée et le cathétérisme de la veine jugulaire) déjà vues lors d'un précédent TP et le cathétérisme du canal cholédoque. Ils étudieront ensuite la vitesse de sécrétion de la bile en basal puis après injection intraveineuse de bile ou d'un sel biliaire semi-synthétique.

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

Réduction : les étudiants, répartis en binôme, travailleront avec un rat par binôme. Ce TP sera réalisé peu de temps après un autre TP (déjà soumis pour autorisation), où la réalisation de l'intubation de la trachée et du cathétérisme de la veine jugulaire ont déjà été observés et / ou pratiqués. En effet lors de ce 1er TP, l'étudiant A a mis en place le cathéter dans la trachée et l'étudiant B dans la veine jugulaire. Lors du TP sur la sécrétion biliaire, les binômes seront conservés ce qui permettra aux étudiants d'inverser leur rôle (étudiant A faisant le cathétérisme de la jugulaire et étudiant B réalisant la trachéotomie). Ce fonctionnement permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés lors de ce TP tout en garantissant l'apprentissage de ces techniques par les étudiants.

Chaque année, 7 groupes de 14 étudiants au maximum réaliseront ce TP.

A chaque séance de TP deux enseignants encadrent 2 groupes d'étudiants simultanément dans 2 salles séparées.

Chaque enseignant réalise, sur un animal, une démonstration détaillée des actes fondamentaux à effectuer au cours de l'expérimentation (étape par étape : au fur et à mesure de l'avancement du TP). De plus, le cathétérisme du canal cholédoque étant une procédure délicate à réaliser, les rats de démonstration pourront être utilisés par les étudiants qui ne réussiraient par ce cathétérisme. Ceci évite d'inclure des animaux supplémentaires.

Pour chaque groupe de 14 étudiants, 8 rats seront nécessaires (1 pour chacun des 7 binômes + 1 pour la démonstration par l'enseignant). Soit un total de  $8 \times 7 = 56$  rats par an soit 280 animaux sur 5 ans.

De plus, comme les rats utilisés dans ce TP proviendront de notre propre élevage, des mâles et des femelles seront utilisés indifféremment pour ce TP. Ceci nous permettra d'utiliser au mieux les animaux de notre élevage et ainsi de limiter au maximum d'avoir des animaux surnuméraires.

Raffinement : les animaux seront hébergés en groupe de 5 à 9 animaux socialement harmonieux, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence de deux éléments d'enrichissement (tunnel en plastique et bâton à ronger ou noix). Les animaux seront anesthésiés tout le long du TP. La profondeur de l'anesthésie sera évaluée avant de commencer la 1ère procédure mais également tout au long du TP, par les étudiants et le personnel enseignant. Tout signe de réflexe de l'animal induira l'administration immédiate d'une dose supplémentaire d'anesthésique. Pendant toute la durée du TP, les animaux seront placés sous une lampe afin d'éviter toute hypothermie. Le fait que les étudiants aient déjà vu voire pratiqué les techniques chirurgicales de base améliore leur travail sur les animaux et garantit une meilleure réussite des différentes procédures et donc de l'ensemble de ce TP plus complexe.

Remplacement : l'apprentissage de ces procédures chirurgicales ainsi que l'évaluation des étudiants sur ces pratiques sont inscrits dans le programme pédagogique national, que nous sommes tenus de respecter. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant la formation adéquate des étudiants. Tous les animaux expérimentaux utilisés sont des rats mâles ou femelles albinos. Ce modèle, bien connu du point de vue physiologique, présente un avantage indéniable pour des étudiants (pour lesquels il s'agit des premières expériences d'intervention sur l'animal) en raison de sa taille (surveillance aisée de l'animal entier anesthésié) et de la taille suffisamment grande de la trachée, de la veine jugulaire et du canal cholédoque. De plus, l'absence de vésicule biliaire chez le rat en fait un modèle de choix pour étudier en direct la régulation de la sécrétion de la bile (produite par le foie), puisque celle-ci n'est pas stockée dans la vésicule biliaire comme chez d'autres espèces (y compris l'humain).

6373. Afin de répondre aux exigences réglementaires de contrôle de qualité de vaccins vétérinaires destinés à l'espèce cunicole, bénéficiant d'une AMM, ce projet vise à confirmer l'identité, le titre et l'efficacité par épreuve de vaccins au moyen de procédures de classe de gravité modéré et sévère.

Objectifs :

Le projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires dans la constitution d'un dossier d'AMM. Les tests ont pour but de garantir l'identité, le titrage et le contrôle par épreuve d'une souche vaccinale ou d'un principe actif. Ils sont effectués sur espèce cible.

Evaluation des avantages et dommages :

Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections des vaccins et aux manipulations. Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent.

Les animaux peuvent développer les symptômes liés à la maladie virale, des antalgiques sont systématiquement mis en place pour les titrages et les contrôles par épreuve.

Ces tests garantissent une commercialisation de vaccins qui sont sûrs et efficaces pour l'animal. Les tests ont lieu selon le cadre approuvé par les autorités réglementaires et permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage : jusqu'à 490 lapins. Le nombre indiqué est calculé en fonction du nombre de vaccins à tester et des réglementations des différents pays destinataires.

Mise en avant des 3R :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour la mise sur le marché de lot commercial. Il n'est actuellement pas possible de le remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays.

Réduire : le sexe et le nombre d'animaux sont imposés par la réglementation.

Raffinement : Des antalgiques sont mis en place pour les animaux développant des signes cliniques.

Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements ont été instaurés dans les hébergements. Dans les box, des bacs sont placés dans le but de servir de jeux et d'abris.

6374. Il s'agit de répondre aux exigences réglementaires de contrôle de qualité de vaccins vétérinaires bénéficiant d'une AMM.

Objectifs :

Ce projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires dans la constitution du dossier d'AMM. Les tests ont pour but de déterminer l'activité des vaccins aviaires

Les contrôles d'activité par épreuve et de titrage se basent sur le développement ou non de la pathologie après injection de la souche. L'identité d'un principe actif est confirmée grâce à l'apparition de signes cliniques spécifiques.

Ils sont effectués sur espèce cible. Les animaux atteints montrent les symptômes liés aux maladies infectieuses testés.

Avantages et dommages :

Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux injections des vaccins et aux manipulations. Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent.

Les animaux peuvent développer les symptômes liés à la maladie virale, dans ce cas des antalgiques ou des points limites sont systématiquement mis en place.

Ces tests garantissent une commercialisation de vaccins qui sont sûres et efficaces pour l'animal. Les tests ont lieu selon le cadre approuvé par les autorités réglementaires et permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage nous utiliserons au maximum 6500 poulets sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour la mise sur le marché de lot commercial. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de tous les pays.

Réduire : le nombre d'animaux est imposé par la réglementation des pays. Une réduction du nombre d'animaux est possible grâce à la mise en commun de lots témoins lorsque la configuration le permet.

Raffinement : Des antalgiques sont mis en place pour les animaux développant des signes cliniques.

Des points limites précoces sont mis en place. Le personnel vérifie l'évolution de l'état général et si les points limites spécifiques sont atteints. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

6375. Les ruminants sont amenés à être traités avec des médicaments vétérinaires lorsqu'ils sont malades ou de manière préventive. Des textes officiels encadrent des études qui permettent de s'assurer de l'absence de résidus de ces produits vétérinaires 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 après calcul statistiques.

Avant et possiblement après l'administration du médicament, des prises de sang seront réalisées afin de suivre la santé de l'animal et/ou la concentration du principe actif dans l'organisme.

L'hébergement s'effectue dans des conditions normales d'hébergement de ces animaux. Les animaux seront généralement hébergés en troupeau et auront accès à une pâture sauf contrainte liée au protocole. Une évaluation quotidienne de l'état de santé général de l'animal sera réalisée pour une détection précoce de signes cliniques anormaux et une prise en charge rapide des animaux.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress lié à la contention.

Le but du projet est de tester 25 formulations chez les bovins et les ovins. Le nombre d'animaux inclus pour tester chaque formulation est généralement de 20 (4 animaux par temps d'abattage, 5 temps d'abattage), ce qui correspond à un nombre permettant la robustesse des résultats obtenus.

Le nombre total d'animaux prévu est donc de 500 pour chaque espèce sur une durée de projet de 5 ans.

6376. Le projet a pour objectif d'évaluer l'impact mécanique d'un aliment sur l'amélioration de la santé bucco-dentaire (gencives, plaque, tartre) chez le chien. Un plan expérimental croisé a été développé pour réduire au minimum le nombre d'animaux pour cette étude. Dans les conditions de l'étude, il a été calculé qu'il était nécessaire d'utiliser un minimum de 16 chiens par aliment testé afin de mettre en évidence des différences statistiques significatives. Ainsi, pour l'évaluation de 2 aliments, un total de 32 chiens sera utilisé. Les techniques de mesure impliquées ne sont pas invasives, et ne provoquent pas de douleur. Dans le cadre de cette étude, les animaux seront soumis à une anesthésie. Celle-ci est nécessaire pour procéder au détartrage des dents avant le démarrage de l'étude, et lors de l'évaluation du niveau de formation de la plaque et du tartre. Elle a également pour but de réduire toute angoisse ou tout stress qui pourrait être ressenti par l'animal au moment du détartrage, ou lors de l'évaluation bucco-dentaire. Par ailleurs, pendant toute la durée du projet, les chiens continueront de bénéficier d'un niveau élevé de contacts sociaux quotidiens avec leurs congénères et le personnel soignant (sorties en parc avec d'autres chiens, promenade, toilettage), contribuant ainsi à maintenir un niveau élevé de bien-être correspondant au niveau courant appliqué. Les détartrages effectués lors de cette étude seront comptabilisés dans le programme annuel de médecine préventive. En effet, celui-ci prévoit un à deux détartrage(s) annuel si besoin. Ceci évitera ainsi une nouvelle anesthésie dans le cadre des soins courants des chiens. Ce projet contribue au développement d'aliments destinés à améliorer la santé bucco-dentaire des chiens.

6377. Ces TP concernent des étudiants de première année après le BAC dans le cadre des enseignements de physiologie animale. Ces étudiants sont destinés à la profession de technicien et doivent être à même de trouver un emploi dans des instituts de recherche publique (INSERM, INRA, CNRS...) ou dans des structures privées, par exemple dans le domaine de la pharmacologie. Ils peuvent donc être amenés, au cours de leur carrière, à travailler sur des animaux vivants. Les professionnels susceptibles de les recruter souhaitent que ces étudiants soient bien formés aux techniques utilisées en expérimentation animale.

Au cours de ce TP, les étudiants apprennent trois techniques chirurgicales de base : l'intubation de la trachée, le cathétérisme de l'artère carotide et de la veine jugulaire. Ils effectuent également un prélèvement de sang afin de mettre en évidence le phénomène d'hémolyse. Dans ce cadre, ce TP a des objectifs pédagogiques et de formation relatifs à la biologie, la physiologie et l'expérimentation animale.

Réduction : les étudiants sont répartis par binôme avec un rat par binôme. Un deuxième TP, portant sur la sécrétion biliaire chez le rat, a lieu peu de temps après celui-ci et comporte, entre autres, la réalisation de l'intubation de la trachée et du cathétérisme de la jugulaire. Ainsi lors de ce TP d'hémolyse, l'étudiant A mettra en place le cathéter dans la trachée et l'étudiant B dans la veine jugulaire. Lors du TP suivant, les binômes seront conservés ce qui permettra aux étudiants d'inverser leur rôle (étudiant A faisant le cathétérisme de la jugulaire et étudiant B réalisant la trachéotomie). Les étudiants réalisent le cathétérisme de la carotide ensemble. Ce fonctionnement permet de réduire le nombre d'animaux utilisés lors de ces TP tout en garantissant l'apprentissage de ces techniques par les étudiants.

Chaque année, 7 groupes de 14 étudiants au maximum réaliseront ce TP.

A chaque séance de TP deux enseignants encadrent 2 groupes d'étudiants simultanément dans 2 salles séparées (note : un seul enseignant pour le 7<sup>e</sup> groupe).

Chaque enseignant réalise, sur un animal, une démonstration détaillée des actes fondamentaux à effectuer au cours de l'expérimentation (étape par étape : au fur et à mesure de l'avancement du TP).

Pour chaque groupe de 14 étudiants, 8 rats seront nécessaires (1 pour chacun des 7 binômes + 1 pour la démonstration réalisée par l'enseignant). Soit un total de  $8 \times 7 = 56$  rats par an soit 280 animaux sur 5 ans.

Il est à noter que les rats utilisés dans ce TP proviendront de notre propre élevage. Afin d'utiliser au mieux les animaux de cet élevage et de limiter au maximum d'avoir des animaux surnuméraires, des mâles et des femelles seront utilisés indifféremment pour ce TP.

Raffinement : les animaux seront hébergés en groupe de 5 à 9, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence de deux éléments d'enrichissement (tunnel en plastique et bâton à ronger ou noix). La profondeur de l'anesthésie sera évaluée avant de commencer la procédure mais également tout au long du TP, par les étudiants et le personnel enseignant. Tout signe de réflexe de l'animal induira l'administration immédiate d'une dose supplémentaire d'anesthésique. Pendant toute la durée du TP, les animaux seront placés sous une lampe afin d'éviter toute hypothermie.

Le cathétérisme de l'artère carotide permet aux étudiants de se familiariser avec cette technique qui sera réutilisée lors d'un autre TP portant sur la sécrétion biliaire.

Remplacement : l'apprentissage de ces gestes chirurgicaux ainsi que l'évaluation des étudiants sur ces pratiques sont inscrits dans le programme pédagogique national, que nous sommes tenus de respecter. Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant la formation adéquate des étudiants. Tous les animaux expérimentaux



utilisés sont des rats mâles ou femelles albinos. Ce modèle, bien connu du point de vue physiologique, présente un avantage indéniable pour des étudiants (pour lesquels il s'agit des premières expériences d'intervention sur l'animal) en raison de sa taille (surveillance aisée de l'animal entier anesthésié) et de la taille suffisamment grande de la trachée et des vaisseaux.

6378. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques susceptibles d'agir sur le système nerveux, en particulier sur le système nerveux central. Le contexte dans lequel sont utilisées les différentes procédures est principalement la sécurité et accessoirement l'efficacité pharmacologique.

Les procédures utilisées dans ce projet ont été caractérisées de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de pharmacologie. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être totalement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leurs effets potentiels chez l'humain.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre total d'animaux utilisés.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 11600.

Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

6379. La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) correspond à un groupe hétérogène de neuropathies périphériques chroniques héréditaires rares avec déficits moteurs et sensoriels. C'est l'un des troubles neurologiques dégénératifs les plus courants qui, tout en étant qualifié de rare, présente un taux de prévalence "élevé" (prévalence moyenne de 2,63 / 10 000 personnes). La CMT se caractérise par une diminution de la force musculaire et une fonte des muscles au niveau des extrémités, une déformation du pied, des douleurs musculo-squelettiques et neuropathiques, la perte de dextérité, la fatigue et la perte sensorielle. A ce jour, il n'existe aucun traitement pour inverser ou ralentir le processus de la maladie.

Certaines anomalies génétiques à l'origine de la CMT entraînent la démyélinisation des nerfs périphériques. A chacun des gènes mutés entraînant la démyélinisation, correspond un sous-type de CMT. Le sous-type CMT1A est de loin la forme la plus commune avec 40 à 50% des cas. Le défaut génétique à l'origine de la CMT1A est une duplication du chromosome 17 contenant un gène codant pour une protéine constituante de la myéline des nerfs périphériques. La surexpression de ce gène provoque un stress cellulaire aboutissant au dysfonctionnement des cellules de Schwann chargées de la production des protéines de la myéline, ayant pour conséquence un dysfonctionnement des nerfs périphériques associé à des défauts de conduction de l'influx nerveux.

En réponse au stress, les cellules activent divers mécanismes de défense dans le but de contrôler et de réduire le stress cellulaire afin de protéger l'intégrité cellulaire. Dans certaines conditions pathologiques de stress chronique, comme dans le cas d'anomalies génétiques, ces mécanismes de contrôle se retrouvent dans l'incapacité de rétablir l'homéostasie cellulaire ce qui peut conduire à d'importants dysfonctionnements pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

Le but de cette étude est de produire des animaux pour un client cherchant à développer un traitement pharmacologique capable de diminuer le stress cellulaire associé à la duplication du gène d'intérêt afin de protéger les cellules de Schwann et ainsi palier au dysfonctionnement des nerfs périphériques. Pour cela, il est nécessaire d'employer un modèle qui soit le plus proche possible de la maladie humaine. La souris C3-PMP, (modèle murin de CMT1A, est une lignée de souris transgénique qui exprime 3-4 copies du gène d'intérêt humain. Ces animaux montrent les premiers signes de la maladie à 3 semaines et développent une insuffisance neuromusculaire légère associée à une capacité motrice anormale, des défauts de coordination ainsi qu'une hypoactivité. A l'âge adulte, ces animaux montrent une vitesse de conduction nerveuse réduite et stable très similaire à ce qui est observé chez les patients atteints de CMT1A. Ce modèle, au plus proche de la maladie humaine, est donc très pertinent pour le développement de traitements pharmacologiques.

Pour le développement d'une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de la CMT1A, l'élevage et la production de lots de souris C3-PMP est nécessaire ce qui fait l'objet de cette demande de projet. La génération de lots de souris C3-PMP sera également nécessaire en amont afin de caractériser la fenêtre d'activation du stress cellulaire associé à la surexpression de gène d'intérêt dans ce modèle. Pour réaliser ce projet, des souris mâles et femelles C3-PMP ainsi que des souris Wild type (Wt) C57B6/J seront nécessaires. La génération de lots de souris C3-PMP sera réalisée en croisant des souris femelles C3-PMP hétérozygotes (He) avec des souris mâles Wild type car les animaux homozygotes (Ho) ne se reproduisent pas bien. Des animaux Ho pourront néanmoins être utilisés pour réaliser des fécondations in-vitro (FIV) dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés pour l'amplification de la lignée.

Pour pouvoir répondre aux besoins du client et livrer les lots requis pour ses études, nous estimons qu'un total de 1900 animaux sera utilisé dans ce projet (reproducteurs, animaux expédiés et animaux de non intérêt compris).

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement. Les animaux seront placés dans des conditions optimales de température avec un cycle jour/nuit de 12h/12h, ils auront accès sans restriction à l'eau et à la nourriture et seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié.

A l'heure actuelle aucun traitement n'est disponible pour le traitement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth 1A. Le but de ce projet est de développer et de tester un nouveau traitement pharmacologique capable de ralentir le développement et la progression de la maladie. Cette étude entre dans le cadre du développement d'une nouvelle approche thérapeutique pour les patients atteints de CMT1A.

6380. L'achondroplasie est une maladie génétique rare qui entraîne un retard de croissance associé à de nombreuses complications parfois sévères. C'est une maladie autosomique dominante causée par une mutation du gène codant pour FGFR3 (Fgfr3ach). Cette mutation entraîne la forme de nanisme la plus fréquente chez l'homme (l'achondroplasie). Aucun traitement n'existe, actuellement, pour cette maladie génétique.

L'objectif de ce projet est de maintenir une lignée de souris portant la mutation du gène FGFR3 et de produire les lots destinés à l'étude du traitement de cette maladie. En effet, le phénotype exprimé par ce modèle est similaire à l'achondroplasie chez l'homme et permet donc son étude.

Les animaux générés dans cette étude seront destinés à une équipe de recherche travaillant sur le développement d'un traitement de l'achondroplasie humaine.

L'élevage étant conduit dans le respect des 3R, et vu le caractère dommageable du phénotype, un suivi adapté sera mis en place sur la phase critique lors de la croissance. En effet, lors de la phase de développement, de la naissance à 22 jours, des paralysies peuvent apparaître lors de la croissance. Aussi, durant cette phase délicate, afin d'éviter toute souffrance, un suivi particulier et des points limites adaptés seront mis en place. Ces points limites seront élaborés sur le degré de paralysie et son impact sur l'état général de l'animal. Après cette période, post sevrage, aucune complication justifiant la prolongation du suivi n'a été observé à ce jour. Cependant, un bilan rétrospectif sera effectué afin de confirmer l'absence d'expression de phénotype dommageable après le sevrage.

Les animaux seront élevés dans les conditions correspondant à leur besoin, avec un enrichissement adapté.

Selon le projet décrit par l'équipe de recherche, une production de 3416 animaux est programmée sur 5 ans, ce nombre est le nombre minimum permettant d'obtenir des résultats robustes.

6381. Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrant du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Nous avons initié un programme de recherche pour caractériser ces tumeurs et montré qu'elles sont très différentes des gliomes de l'adulte et des tumeurs corticales de l'enfant. Par ailleurs, les DIPG ne forment jamais de masse tumorale, mais infiltrent les structures cérébrales normales puis se disséminent dans la totalité du cerveau. Ces propriétés d'invasion, caractéristiques des DIPG, et une cause fréquente de rechute après une radiothérapie initiale limitée au tronc cérébral, reposent sur d'importantes interactions entre la tumeur et son microenvironnement qui peuvent être étudiés exclusivement dans des modèles vivo.

La compréhension des processus pathogéniques particuliers de ces tumeurs demeure un challenge afin d'identifier des cibles appropriées pour de futurs développements thérapeutiques. Compte tenu de la rareté du matériel tumoral, le développement de modèles de xénogreffes orthotopiques (xénogreffe dans le site originel du matériel tumoral) est décisif pour atteindre cet objectif. Pour cela, nous injecterons des lignées cellulaires dérivant de tumeurs de patients dans les régions du tronc cérébral de souris adultes immunodéficientes (Nude).

Pour respecter la règle des trois R, nous développons en parallèle des modèles alternatifs de type culture cellulaire pour soutenir nos hypothèses qui devront ensuite être validées *in vivo* dans leurs modèles correspondants orthotopiques, comme par exemple l'efficacité anti-tumorale d'un médicament. Pour limiter la douleur engendrée par le développement de la tumeur, les animaux pourront recevoir un antalgique adapté en fonction de leur état clinique. D'après notre expérience passée, la tumorigénicité de nos modèles *in vitro* de DIPG avoisine 50 % avec une prise tumorale de 100% toutes lignées confondues. Dans ce contexte et afin d'obtenir un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents types tumoraux, nous grefferons la totalité des tumeurs qui seront mises à notre disposition. Pour chaque nouvelle tumeur, nous grefferons au maximum 10 souris (statistiquement significatif) sous anesthésie que nous suivrons longitudinalement par bioluminescence. Nous recevons au maximum 20 tumeurs par an, il est donc prévu pour le développement de nouveaux modèles un maximum de 600 souris pour les 3 années du projet. Nous étudierons aussi la biologie de la tumeur en séquençant les acides nucléiques extraits des cellules tumorales et du microenvironnement à trois stades plus ou moins avancés de la maladie, soit l'utilisation de 216 souris. Au total, nous envisageons donc d'utiliser un maximum de 816 souris sur les 3 ans du projet.

6382. L'asthme allergique est une maladie inflammatoire des bronches qui touche en France environ 6% de la population et qui est à l'origine de 1000 décès par an. On le définit comme une gêne respiratoire plus ou moins sévère qui s'explique par une réaction du système immunitaire du patient à la présence d'un allergène. Cette pathologie met en jeu plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires complexes dont une meilleure compréhension est nécessaire pour développer une nouvelle approche thérapeutique.

Plusieurs éléments de la littérature convergent vers un rôle important de certaines molécules solubles impliquées dans l'énergie cellulaire dans cette pathologie à la fois chez l'homme et dans des modèles expérimentaux murins. Nous ne connaissons pas encore précisément comment agissent ces molécules. L'identification d'une des cibles pourrait amener au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle expérimental d'asthme allergique chez la souris afin de pouvoir prélever, une fois la réaction d'inflammation bronchique établie, différents échantillons (organes, sang, lavages broncho-alvéolaires...). Ce modèle, largement accepté par différents laboratoires spécialisés, repose sur une pré-sensibilisation des souris à de l'ovalbumine de poulet couplé à une substance bien caractérisée qui va renforcer la réponse immune, puis à la ré-exposition deux semaines plus tard à ce même allergène par voie nasale. Ce protocole expérimental conduit à une infiltration cellulaire dans les poumons ainsi qu'à une production d'anticorps spécifiques de l'allergène. Il ne conduit pas à une difficulté respiratoire de l'animal de type asthmatiforme.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux. Une analyse de variances de type ANOVA avec un post test Bonferroni sera réalisée entre les groupes.

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

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Une fiche de suivi sera mise en place tout au long du protocole expérimental afin de s'assurer du bien-être des animaux. Une attention particulière sera portée aux animaux qui seront soumis à des traitements supprimeurs de cellules sanguines pouvant conduire à une fatigue. Chaque geste invasif sera associé à une anesthésie (i.e. administration par voie intranasale se fait sous anesthésie gazeuse légère)

Ce projet nécessitera 464 souris au maximum.

6383. Les chevaux sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans le domaine de la santé animale. Ils sont notamment inclus dans des études de pharmacocinétique dont le but est de suivre la concentration d'un produit d'intérêt médical dans le sang au cours du temps.

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 chevaux, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins, soit par ponction directe, soit en utilisant un cathéter intraveineux par lequel on peut aspirer du sang.

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 60 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 nécessaires, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Au total, au maximum 720 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 de la veine jugulaire.

Cependant, il sera possible pour éviter de trop multiplier les ponctions source de stress et de douleur de poser un cathéter intraveineux par lequel on pourra aspirer du sang et qui restera à demeure pendant toute la période des prélèvements sanguins.

L'hébergement individuel pourra dans ce cas être requis afin d'éviter que les animaux ne s'arrachent leurs cathéters, une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement...

6384. Les porcins sont régulièrement utilisés dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible) et dans le domaine de santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible).

Dans ce type d'étude, un suivi des modifications hématologiques, biochimiques et/ou enzymatiques (sang/urine), des potentielles modifications macroscopiques et microscopiques des tissus et organes et/ou suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les urines, détection dans les tissus) est également possible.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales: la procédure d'administration du produit à tester, la procédure de prélèvements sanguins répétés. De plus des prélèvements de différents tissus ou organes seront parfois nécessaires.

Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés majoritairement par groupe ou de façon individuelle que si nécessaire.

L'hébergement des animaux est conforme à la directive en vigueur et conforme au programme d'enrichissement du milieu.

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...).

Au total, le nombre maximum d'animaux qui seront nécessaires à la réalisation de ce projet est de 500 pour les 5 années du projet.

6385. Les bovins sont régulièrement utilisés dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible). Ils sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale,) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible).

Dans ce type d'étude, un suivi des modifications hématologiques, biochimiques et/ou enzymatiques (sang/urine), des potentielles modifications macroscopiques et microscopiques des tissus et organes et/ou suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les urines, détection dans les tissus) est également possible.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales: la procédure d'administration du produit à tester, la procédure de prélèvements sanguins répétés. De plus, des prélèvements d'urine (uniquement chez les femelles), de différents tissus ou organes seront parfois nécessaires.

Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés majoritairement par groupe ou de façon individuelle que si nécessaire.

L'hébergement des animaux est conforme à la directive en vigueur et conforme au programme d'enrichissement du milieu.

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...).

Au total, le nombre maximum d'animaux qui seront nécessaires à la réalisation de ce projet est de 500 pour les 5 années du projet.

6386. Ce projet va explorer l'hypothèse que l'aggravation des maladies allergiques résulterait du mode de vie actuel caractérisé par une alimentation riche en gras et en saccharose et par une exposition quotidienne à de multiples polluants présents notamment dans l'alimentation. L'objectif de ce projet est donc double : 1/ déterminer si une nourriture riche (gras/sucré) favorise effectivement le développement de maladies allergiques et quels sont les mécanismes impliqués ; 2/déterminer si les polluants de l'environnement identifiés comme perturbateurs endocriniens et métaboliques dans différentes études publiées dans la littérature peuvent jouer le rôle de perturbateurs immunologiques. En effet, dans un précédent projet, il a été montré dans un modèle souris que la présence d'un mélange de 4 polluants (Dioxine TCDD, DEHP, Bisphénol A, PCB153) proposée tout au long de la vie, provoquait dans la descendance de 1ère génération des désordres métaboliques différents selon le régime, le sexe et l'âge alors même que les doses de polluants utilisées étaient proches de la dose journalière tolérable (DJT) pour l'Homme. On sait, en effet, que les maladies allergiques sont en constante augmentation dans les pays industrialisés au premier rang desquelles l'eczéma ou dermatite allergique de contact (DAC), qui touche 20% de la population dans les pays industrialisés. Une des causes avancées est l'exposition croissante et quotidienne des individus à des substances chimiques appelées haptènes, présentes dans l'alimentation ou l'environnement professionnel. Les haptènes entrent

dans la composition de nombreux produits industriels (colorants, stabilisants, antioxydants...), les fragrances de parfums et certains métaux. Chez l'individu sain, de puissants mécanismes de régulation appelés 'tolérance orale' qui siègent dans l'intestin et le foie, permettent de contrôler les manifestations allergiques consécutives à l'absorption d'allergènes alimentaires (haptènes). Les allergies (alimentaires, eczéma, asthme,...) sont également augmentées chez les sujets obèses, ce qui suggère que l'obésité pourrait être associée à une dérégulation du système immunitaire pouvant entraîner à la fois une inflammation métabolique observée chez les patients obèses et une diminution des mécanismes de tolérance, à l'origine de l'augmentation des problèmes allergiques chez ces sujets.

La tolérance orale peut être induite chez la souris dans le modèle de DAC par administration orale de l'haptène avant l'exposition cutanée ce qui entraîne une prévention de la réaction allergique. Il s'agit d'un modèle pré-clinique de référence, largement utilisé par les laboratoires de recherche parce qu'il reproduit la physio-pathologie de la DAC chez l'homme.

Le recours aux études *in vivo* est indispensable pour répondre aux questions posées dans ce projet, compte tenu de la complexité des mécanismes en jeu dans la tolérance orale, qu'il est impossible de reproduire dans des tests *in vitro*. Cependant, le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire permettant l'interprétation statistique des résultats. Les conditions d'élevage, d'hébergement et de soin ainsi que les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire au maximum toute douleur, souffrance ou stress des animaux.

Pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, de l'ordre de 190 souris sont nécessaires. L'étude sera de 3 ans.

6387. La dépression et le diabète de type 2 (DT2), caractérisées par une hyperglycémie et une résistance de l'organisme à l'insuline, font partie des maladies ayant le plus fort impact sur la santé publique dans le monde. De nombreuses études réalisées chez l'homme ou sur des modèles animaux montrent que ces deux pathologies sont étroitement liées. Nous venons par exemple de mettre en place un modèle murin permettant l'étude de la comorbidité DT2/troubles de l'humeur. Ainsi, nous montrons que des souris soumises pendant 12 semaines à un régime enrichi en gras et en sucre développent une obésité et un DT2 (surpoids, hyperglycémie à jeun, intolérance au glucose et résistance à l'insuline) associés à un comportement de type anxieux. Les mécanismes cellulaires liant la régulation du métabolisme énergétique et des humeurs restent peu connus. Le but de ce projet est de déterminer des acteurs clés des métabolismes énergétiques peuvent directement moduler les réseaux neuronaux contrôlant les émotions.

Au niveau du système nerveux central, les neurones sérotoninergiques (neurones 5HT) du Raphé dorsal (RD) jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'humeur et le développement de troubles de type anxio-dépressifs. Des données de la littérature suggèrent que la libération de sérotonine dans diverses régions cérébrales impliquées dans le contrôle des humeurs ou du métabolisme énergétique est altérée lorsque le statut énergétique de l'organisme est perturbé en conditions physiologiques ou pathologiques telles que:

- après un repas,
- en réponse à un jeûne ou une hypoglycémie induite par l'injection d'insuline,
- lors d'un DT2 ou d'une obésité.

Ces données suggèrent que des nutriments (glucose, acides gras) et hormones contrôlant le métabolisme énergétique (insuline, ghréline) peuvent moduler l'activité électrique des neurones sérotonine de Raphé dorsal. Néanmoins, cela n'a jamais été directement mis en évidence. Ainsi, ce projet vise à étudier l'activité électrique des neurones 5HT du Raphé dorsal en réponse à des modifications de la concentration en glucose, acides gras, insuline et ghréline. L'activité électrique de ces neurones HT sera également étudiée en condition pathologique d'obésité et de DT2 après 12 semaines d'une alimentation enrichie en gras et en sucre.

Ceci sera réalisé par électrophysiologie en patch-clamp sur tranche fraîche de cerveau de souris transgénique Pet1-cre-mCherry permettant de visualiser les neurones 5HT du Raphé dorsal. Cette étude nécessite l'utilisation d'animaux car l'établissement d'un modèle présentant la comorbidité Obésité-DT2/anxiété, ne peut pas être reproduit *in vitro* sur des lignées de neurones, rendant impossible le remplacement de celle-ci. De plus, l'utilisation de tranches de cerveaux est nécessaire pour pouvoir apprécier la spécificité de détection des paramètres métaboliques par rapport à d'autres neurones non-HT dans le Raphé dorsal. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum grâce à l'utilisation de tests statistiques montrant la significativité de différence entre plusieurs groupes. Toutes les précautions possibles (anesthésie, enrichissement des cages d'hébergement) seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux l'inconfort des animaux. Au total, 240 souris mâles seront utilisées sur une durée de 4 ans.

6388. Les dispositifs médicaux (DM) doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin d'évaluer leur biocompatibilité selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. Ce projet décrit ici et définit dans la norme ISO 10993-11 a pour objectif la protection des êtres humains contre les risques biologiques potentiels de l'utilisation de DM et en particulier les risques concernant la toxicité systémique aiguë, c'est à dire après une seule administration de l'échantillon à tester. Les effets généralisés, ainsi que les effets sur les organes peuvent résulter de l'absorption, de la distribution et du métabolisme des substances relarguées à partir du dispositif ou ses matériaux à des parties du corps avec lesquelles ils ne sont pas en contact direct.

La conception de l'étude appropriée doit être adaptée à la nature des matériaux du dispositif et à son application clinique prévue.

Il n'y a pas de critère absolu de sélection d'une espèce animale particulière pour les essais de toxicité systémique. Pour les études sur l'exposition aiguë par voie orale, intraveineuse, intrapéritonéale et cutanée de dispositifs médicaux, la souris ou le rat est l'animal préféré.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 40 (jeunes adultes, tel que défini dans la norme). Ils disposent d'un enrichissement de leur environnement (tunnels en carton pour rongeurs).

Les études présentées dans ce projet ont toutes pour but l'évaluation de la toxicité systémique après administration unique d'un dispositif médical. La voie d'administration devra être choisie en fonction du type de DM à évaluer et de son indication clinique chez le patient. En fonction du DM, il pourra être administré soit tel quel, soit après dilution dans le véhicule approprié, soit sous forme d'extraits polaires et apolaires pour les dispositifs ne pouvant être administrés tels quels. Dans ce dernier cas, afin d'évaluer la totalité du dispositif, un extrait sera réalisé dans un solvant polaire pour tester les substances qui pourraient être relarguées en milieu aqueux et un extrait sera réalisé dans un véhicule apolaire pour tester les substances qui pourraient être relarguées en milieu huileux. L'extrait polaire sera administré par voie intraveineuse et l'extrait apolaire sera administré par voie intrapéritonéale chez la souris.

Les matières corrosives ou irritantes connues pour causer une douleur ou une détresse marquée doivent être signalées comme telles et n'ont pas besoin d'être testées.

Par ailleurs, les points limites suivants ont été définis et conduisent à une décision d'euthanasier l'animal pour éviter toutes souffrances inutiles :

Signes observés seuls amenant à une euthanasie de l'animal : convulsions continues pendant 5 minutes, vocalisations continues pendant plus d'une minute en l'absence de contention, perte de poids  $\geq 20\%$  sur 72 heures, hémorragie importante.

Signes en association pouvant amener à une décision d'euthanasier l'animal : cyanose, gasping, piloerection + prostration, animal conscient (réagissant à la stimulation) mais incapable de bouger, animal ne buvant plus et/ou ne mangeant plus, pertes d'équilibre persistantes, détresse respiratoire sévère ou persistante. Le Directeur d'études devra déterminer au cas par cas sur l'association de ces signes, leur intensité et leur persistance dans le temps s'il peut conclure à une mort certaine de l'animal et demander son euthanasie en considérant cette mortalité comme étant attribuable à l'élément d'essai administré.

Les volumes d'administration maximum permettant d'éviter des effets physiologiques uniquement dus à la quantité administrée ne seront pas dépassés. Ces volumes maximums dépendant du mode d'administration et sont fixés par la norme ISO 10993-11.

Ce projet comprend les études suivantes:

- Etude de toxicité systémique aiguë par administration intrapéritonéale: études réalisées chez la souris (10 animaux)  
Il s'agit d'administrer le DM par voie intrapéritonéale puis d'observer les signes cliniques pendant un minimum de 72 heures après administration.

Cette voie d'administration peut être appropriée pour les dispositifs en contact avec la cavité péritonéale ou avec les fluides. Cette voie d'administration est également appropriée lorsque l'extrait ne doit pas être administré par voie intraveineuse, par exemple avec des extraits huileux non polaire et lorsque des particules sont présentes. Cette voie est préférable à la filtration pour une injection intraveineuse.

- Etude de toxicité systémique aiguë par administration intraveineuse: études réalisées chez la souris

Il s'agit d'administrer le DM par voie intraveineuse puis d'observer les signes cliniques pendant un minimum de 72 heures après administration.

Cette voie d'administration peut être adaptée pour des dispositifs en contact direct ou indirect avec les sangs ou les fluides.

- Etude de toxicité systémique aiguë par administration orale: études réalisées chez le rat

Il s'agit d'administrer le DM par voie orale puis d'observer les signes cliniques pendant un minimum de 72 heures après administration.

Cette voie d'administration peut être adaptée pour les dispositifs en contact direct ou indirect avec la muqueuse buccale ou pour des produits avec d'autres applications entérales.

- Etude de toxicité systémique aiguë par administration cutanée: études réalisées chez le rat

Il s'agit d'administrer le DM par application cutanée puis d'observer les signes cliniques pendant un minimum de 72 heures après administration.

Cette voie d'administration peut être adaptée pour les dispositifs en contact uniquement en surface.

Pour ces 4 tests, si aucune mortalité ne se produit et qu'aucune indication toxicologique n'est notée pendant la période d'observation, après l'administration de la dose unique du dispositif, nous considérons que ce dispositif ne présente aucune toxicité après administration par la voie concernée.

6389. Le mot cancer, qui vient d'un mot latin signifiant « crabe », désigne une prolifération anormale des cellules. Presque tous les tissus de notre organisme peuvent être affectés par ce dérèglement dont les causes, les évolutions et les conséquences sont très diverses.

Le cancer n'est pas une maladie unique, mais un groupe de maladies où des altérations génétiques successives ont conduit des cellules initialement normales à une croissance anormale et incontrôlée.

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 7,4 millions de décès en 2004, soit 13% de mortalité mondiale. D'après les projections, leur nombre devrait augmenter pour atteindre, 12 millions en 2030 à l'échelle mondiale.

Dans le cadre de ses activités de recherche pour l'industrie pharmaceutique, notre entreprise initie des programmes de recherche afin d'identifier des candidats médicaments contre le cancer. Les molécules agissant sur les cibles d'intérêts sont sélectionnées en fonction de leurs activités dans des tests cellulaires *in vitro* et de leurs paramètres pharmacocinétiques *in vitro et in vivo*.

Nous mettons en place un processus de sélection des molécules *via* des tests cellulaires ou non-cellulaires *in vitro*. Ces tests permettent de réduire considérablement le nombre de composés à tester chez l'animal.

Les composés présentant le potentiel le plus intéressant sont testés sur des modèles animaux relevant de pathologies humaines. Nous utilisons des animaux immunodéficients sur lesquels peuvent se développer des lignées cellulaires cancéreuses humaines. Ces cellules cancéreuses seront greffées sous la peau des animaux ou de façon chirurgicale dans les organes cibles de cancer. Les animaux greffés seront traités avec des molécules actives ou des molécules de référence. L'efficacité des molécules sera évaluée en mesurant l'évolution de la taille des tumeurs et en mesurant différents biomarqueurs. Les animaux greffés seront observés par des techniciens responsables d'études et par le personnel formé de l'animalerie. Ces animaux seront mis à mort au plus tard aux points limites déterminés dans chaque procédure.

Compte tenu de l'expérience acquise dans ce domaine, nous prévoyons d'utiliser environ 8640 souris sur 5 ans, répartis sur les différents protocoles, en fonction des molécules à tester.

Les molécules seront évaluées dans les procédures multiples d'activité antitumorale et de pharmacocinétique. En raison de variabilité individuelle de croissance de cancer et de l'activité des molécules le nombre des animaux par groupe sera d'environ de 8-10 animaux, soit 70 animaux par étude. Nous avons prévu de réaliser 40 procédures multiples par an.

Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux. Les interventions invasives et faiblement invasives seront réalisées sous anesthésie. L'analgésie pharmacologique sera utilisée après toutes les interventions chirurgicales.

6390. Les dispositifs médicaux doivent faire l'objet d'un ensemble de tests réglementaires de toxicité afin d'évaluer leur biocompatibilité selon la stratégie de tests définie dans la norme ISO 10993-1. Ce projet décrit ici et défini dans les normes ISO 10993-6 et ISO 10993-11 a pour objectif la protection des êtres humains contre les risques biologiques potentiels de l'utilisation de dispositifs médicaux (DM) et en particulier les risques concernant les effets locaux après implantation selon l'ISO 10993-6 et la toxicité systémique avec exposition répétée (toxicité systémique subaiguë, subchronique et chronique selon la durée d'exposition) selon l'ISO 10993-11.

Ces deux risques peuvent être évalués séparément et font l'objet de 2 normes distinctes. Cependant, dans un but éthique et afin de réduire au maximum l'utilisation d'animaux, on s'attachera à coupler ces études, dès que cela est possible, afin d'utiliser les mêmes animaux pour évaluer à la fois les effets locaux et les effets systémiques.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est de 85 (jeunes adultes, tel que défini dans la norme). Ils disposent d'un enrichissement de leur environnement (tunnels en carton).

Ce projet est constitué des études suivantes:

- Evaluation des effets locaux après implantation sous-cutanée: Cette étude est réalisée chez le rat (en général, un total de 5 rats est suffisant pour pouvoir analyser en histologie 10 sites d'implantation par dispositif ou par matériaux. Si l'étude est couplée avec l'évaluation de la toxicité systémique il faut alors ajouter un groupe contrôle séparé, soit un total minimum de 10 rats).

Ce test consiste à implanter chez le rat, en sous-cutané, le dispositif médical ou un échantillon représentatif de ce dernier. La durée de la période d'observation qui suit dépend de l'indication clinique du dispositif, de sa durée d'exposition chez le patient et de son éventuel temps de dégradation (peut aller de 2 semaines à 1 an). Pendant toute la période d'observation, les animaux seront régulièrement pesés, les sites d'implantation observés pour l'éventuelles apparition de réactions d'intolérance (par exemple présence d'érythèmes ou d'œdèmes). Des observations cliniques sur l'état général des animaux seront également conduites. A la fin de la période d'implantation, les animaux sont euthanasiés et les sites d'implantation sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques. Selon le dispositif à évaluer, il peut être également nécessaire de prélever et d'effectuer les analyses histologiques des ganglions axillaires.

- Evaluation de la toxicité systémique après implantation avec exposition répétée (toxicité systémique subaiguë, subchronique et chronique): Cette étude est réalisée chez le rat (le nombre d'animaux dépend de la durée d'exposition à évaluer et de la nécessité ou non d'étudier les 2 sexes. Le minimum requis est de 10 rats pour une étude de toxicité subaiguë sur un seul sexe et le maximum est de 80 rats pour une étude de toxicité chronique sur les 2 sexes).

Ce test consiste à implanter chez le rat, en sous-cutané, le dispositif médical ou un échantillon représentatif de ce dernier. La durée de la période d'observation qui suit dépend de l'indication clinique du dispositif, de sa durée d'exposition chez le patient et de son éventuel temps de dégradation (peut aller en général de 1 mois, on parle alors de toxicité subaiguë, à 1 an, on parle alors de toxicité chronique). Pendant toute la période d'observation, les animaux seront régulièrement pesés, les sites d'implantation observés pour d'éventuelles apparitions de réactions d'intolérance (par exemple présence d'érythèmes ou d'œdèmes). Des observations cliniques sur l'état général des animaux seront

également conduites. Il peut être également nécessaire pour certaines études de mesurer la consommation alimentaire et hydrique des animaux au cours de toute la phase expérimentale. Une analyse des urines peut également être nécessaire en fin de phase expérimentale. A la fin de la période d'implantation, un prélèvement final de sang est effectué afin de procéder aux analyses biochimiques, hématologiques et enzymologiques. Les animaux sont euthanasiés et les sites d'implantation sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques. Une autopsie complète de l'animal est également réalisée et les principaux organes sont prélevés puis conservés dans un fixateur pour analyses histologiques.

Les points limites suivants ont été définis et conduisent à une décision d'euthanasier l'animal pour éviter toutes souffrances inutiles :

- Signes observés seuls amenant à une euthanasie de l'animal : convulsions continues pendant 15 minutes, vocalisations continues pendant plus d'une minute en l'absence de contention, perte de poids  $\geq 20\%$  sur 72 heures, hémorragie importante, existence d'une plaie ouverte au niveau du site d'implantation qui ne se refermerait pas malgré les soins apportés.

- Signes en association pouvant amener à une décision d'euthanasier l'animal : cyanose, gasping, piloerection + prostration, animal conscient (réagissant à la stimulation) mais incapable de bouger, animal ne buvant plus et/ou ne mangeant plus, pertes d'équilibre persistantes, détresse respiratoire sévère ou persistante. Le Directeur d'études devra déterminer au cas par cas sur l'association de ces signes, leur intensité et leur persistance dans le temps s'il peut conclure à une mort certaine de l'animal et demander son euthanasie en considérant cette mortalité comme étant attribuable à l'élément d'essai administré.

Par ailleurs, ces études peuvent s'étaler sur une longue période (jusqu'à 1 an). De ce fait, certains animaux peuvent développer spontanément des pathologies non liées à l'implantation de l'élément d'essai (par exemple, apparition de tumeurs). Dans ce cas, les possibilités de soins à apporter aux rongeurs sont assez réduites. Ces animaux devront être suivis régulièrement afin de limiter au maximum leurs souffrances et décider ou non de leur euthanasie

6391. Ce projet couvre l'ensemble des essais réalisés dans le cadre d'une mise au point de technique ou de formation interne nécessaires à la réalisation des études réalisées dans l'établissement, études pour lesquelles il n'existe pas d'alternative validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux. Ces études sont réalisées conformément aux principes éthiques. Tout expérimentateur est amené à acquérir, entretenir ou perfectionner une technique impliquant les modèles animaux. Ce projet est dédié à l'entraînement du personnel sur les gestes nécessaires à la bonne réalisation des procédures expérimentales, sur toutes les espèces présentes dans l'établissement. Ces gestes sont acquis à l'occasion de formations, animées par des formateurs soit internes à l'entreprise (transmission des compétences, tutorat) ou externes (mise au point de technique, harmonisation des méthodes d'administration et de prélèvement etc...). Ce projet s'inscrit dans l'obligation réglementaire décrite dans l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. Il permet de s'assurer et de valider la compétence du personnel. Un entraînement régulier et une bonne compétence du personnel, sont indispensables à une réalisation efficace des études, augmentant la fiabilité des résultats, et respectant le bien-être animal par la pratique de gestes maîtrisés.

Le type de geste est choisi et adapté en fonction des besoins d'apprentissage et/ou de perfectionnement. Les techniques d'administrations de produits incluent la voie intrapéritonéale (IP), *per os* (PO), sous-cutanée (SC), intradermique (ID), intramusculaire (IM), intraveineuse (IV) et se font généralement sur animaux vigiles. Les techniques de prélèvements sanguins se font soit sur animaux vigiles, soit sur animaux anesthésiés, selon la technique et l'espèce, mais toujours en accord avec les recommandations des structures éthiques. L'apprentissage des techniques d'examen se fera généralement sur animaux vigiles et, si nécessaire, sous anesthésie. Les gestes pouvant entraîner un stress particulier seront réalisés sous anesthésie.

On peut estimer le nombre d'animaux utilisés chaque année dans le cadre de la formation/entretien de la formation du personnel et/ou mise au point de technique à un maximum de 230 animaux utilisés par an (200 rongeurs, 10 lapins, 10 chiens et 10 primates), ce qui conduit à 920 animaux utilisés pour la durée du projet.

Ces mises au point/formations se faisant de manière occasionnelle, les animaux pourront être réutilisés, en accord avec les principes de la réglementation et sous contrôle des structures éthiques. Dans de rares cas (par exemple, formation aux méthodes d'euthanasie et/ou prélèvements d'organes), les animaux seront euthanasiés mais cet apprentissage sera généralement prévu sur des animaux déjà inclus dans un autre projet. [Autorisation abrogée]

6392. La température corporelle normale des vaches laitières est en moyenne de 38,5° C. Cependant, l'activité métabolique intense du rumen, dont la température est proche des 40°C, les rend sensibles au stress thermique. Ainsi, la plage de température optimale pour le confort des vaches laitières est comprise entre 5 et +25° C. Depuis le début des années 2000, le monde connaît une augmentation en fréquence et en intensité des épisodes de vagues de chaleurs en lien avec le réchauffement climatique qui n'épargne pas les animaux. Les perspectives pour les prochaines années vont dans le sens d'une poursuite de cette tendance. Le stress thermique peut diminuer la productivité en élevage, causer des problèmes de fertilité tels que la réduction de la qualité du sperme et une augmentation de la mortalité embryonnaire dans l'appareil génital femelle donc une diminution du nombre de femelles gestantes, un poids moins élevé à la naissance, et compromettre le système immunitaire. L'oviducte est le lieu de la fécondation et des premières étapes critiques du développement embryonnaire chez les bovins comme chez tous les mammifères. Cependant,



aucune étude à ce jour n'a permis de mesurer chez les vaches la température intra-oviductale et sa régulation en lien avec les variations hormonales endogènes et la température extérieure. Ce projet consiste à étudier la faisabilité d'une telle mesure par l'implantation intrapéritonéale d'un thermocapteur à l'intérieur de l'oviducte (à la jonction ampoule-isthme) chez 3 femelles de race Holstein et à suivre, sur 3 cycles œstraux, l'évolution de la température oviductale en lien avec les températures rectale et extérieure. Le protocole expérimental, qui comprend une procédure classée comme modérée, respecte la règle des 3R :

Remplacement : aucune donnée n'étant disponible à ce jour sur la température oviductale des vaches et ses variations, le recours à l'animal est nécessaire.

Réduction : Cette étude préliminaire possède un caractère exploratoire et vise à étudier la faisabilité de la mesure (mise en place et stabilité du capteur, acquisition de la mesure...). De ce fait l'effectif a été réduit au minimum nécessaire pour le calcul d'une valeur moyenne et d'un écart-type.

Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance continue (activité, rumination) et hébergées sur aire paillée intégrale dans une stabulation récente répondant aux enjeux du bien-être animal chez cette espèce (8 m<sup>2</sup> par animal au minimum (60m<sup>2</sup> pour 7 places au cornadis) 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.

6393. L'homéostasie du glucose est régulée par l'équilibre entre deux hormones, le glucagon et l'insuline. Le glucagon est une hormone hyperglycémiant (élève la glycémie) sécrétée par les cellules alpha des îlots de Langerhans situés dans le pancréas. L'insuline est une hormone hypoglycémiant (diminue la glycémie) sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans.

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique complexe fortement liée à l'obésité, caractérisée par une résistance périphérique à l'insuline, une production de glucose hépatique élevée et un dysfonctionnement de la sécrétion de l'insuline qui entraînent une hyperglycémie chronique. Cette hyperglycémie chronique entraîne de nombreuses complications dont, notamment, des maladies cardio-vasculaires, la cécité ou des infections.

De nouveaux gènes jouant un rôle dans le mécanisme physiopathologique du diabète de type 2 ont été identifiés. Cependant, les fonctions de la plupart des protéines encodées par ces gènes sont inconnues. CaMK1D, qui appartient à la sous famille des protéines kinase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline dépendantes, fait partie de ces nouveaux gènes identifiés dont le rôle reste à explorer.

Plus particulièrement, les données cliniques confirment la participation de CaMK1D dans l'homéostasie du glucose par son influence sur la sécrétion d'insuline dans les cellules pancréatiques  $\beta$ .

Dans le cadre de notre projet, le laboratoire a généré deux modèles de souris génétiquement modifiées, dans lesquelles le gène codant pour CaMK1D est soit invalidé spécifiquement dans le pancréas (Pdx1cre-CamK1D f/f), soit invalidé dans tous les tissus de l'animal (CamK1D KO).

Ces 2 modèles nous permettront d'approfondir la compréhension du rôle de CaMK1D dans l'homéostasie du glucose et le diabète de type 2.

En effet, nos données préliminaires ont montré que les souris CamK1D KO ont une amélioration de la glycémie.

Nous voulons maintenant confirmer ces observations dans les CamK1D KO et évaluer le rôle de cette protéine dans les cellules  $\beta$ . Pour ce faire, nous utiliserons les souris Pdx1cre-CamK1D f/f afin de savoir si la protéine CamK1D est une cible thérapeutique pertinente pour le traitement des patients diabétiques.

Des tests métaboliques seront réalisés sur ces souris soumises à un régime alimentaire standard ou à un régime enrichi en graisse. Ce régime induit une obésité et une résistance à l'insuline plaçant ainsi les souris dans un contexte pré-diabétique.

Remplacement : La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels que la souris.

Réduction : Nous utiliserons un total de 96 animaux. Le nombre d'animaux testés dans chaque expérience nous permettra une comparaison statistique fiable (test ANOVA) entre les différents groupes tout en tenant compte des impératifs de réduction. Par ailleurs, toujours par souci de réduction, les tests métaboliques seront réalisés sur les mêmes animaux.

Raffinement : Les différentes expériences seront réalisées par du personnel qualifié afin d'éviter le stress lié à la manipulation. Les volumes de sang prélevés seront réduits au minimum nécessaire pour nos analyses et les volumes injectés seront proportionnels au poids de chaque animal afin de ne pas entraîner de stress.

6394. Projet : La neurotensine (NTS) est une hormone intestinale libérée principalement à partir des cellules entéro-endocrines de l'intestin grêle en réponse à la consommation de graisse. NTS agit sur trois récepteurs, dont deux sont couplés à la protéine G (NTSR1 et NTSR2) et un seul récepteur possède un récepteur transmembranaire (NTSR3, également appelé SORT1). Chez l'homme, une forte concentration plasmatique d'un fragment précurseur stable de NTS (pro-NTS), reflétant la sécrétion de NTS mature, s'est révélée être un prédicteur indépendant de l'obésité, ainsi que de certaines des principales séquelles de l'obésité: le type 2, le cancer du sein et les maladies cardiovasculaires et la mortalité.

Aussi, nous souhaitons utiliser dans le cadre de ce projet un modèle de souris immunocompétente la C57BL/6j et un modèle de souris obèse. Dans un premier temps nous souhaitons évaluer si l'inhibition de la neurotensine limite la prise de poids et modifie les paramètres biologiques. Dans un second temps, nous souhaitons faire grossir les animaux en leur mettant à disposition de façon *ad libitum* un aliment riche en lipides. Une fois un poids de 35 à 40 g atteint nous évaluerons si l'inhibition de la neurotensine influence le paramètre poids et les paramètres biologiques associés. Les animaux seront soit maintenus sur un régime riche en graisse soit retournerons sur un régime normal.

Type d'animaux : Souris mâles C57BL/6j et B6.V-Lepob/J Rj (souris obèse)

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 510 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Notre projet 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. À 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 afin de déceler une perte de poids, qui serait signe d'une souffrance de l'animal.

6395. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (1/3500 naissances mâles). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X et résulte d'une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché. La thérapie génique, la thérapie cellulaire ou l'utilisation de certaines molécules pharmacologiques font partie des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie ou pour le maintien ou l'amélioration de la fonction musculaire.

Avant le passage chez l'homme, l'efficacité thérapeutique de ces différentes approches est aujourd'hui validée à l'aide essentiellement de deux modèles animaux de la DMD : la souris mdx et le chien GRMD (pour Golden Retriever Muscular Dystrophy), tous deux porteurs d'une mutation dans leur gène de la dystrophine. Ces 2 modèles, bien que largement utilisés, présentent cependant un certain nombre d'inconvénients :

- La souris mdx ne reproduit que partiellement les lésions tissulaires retrouvées chez les patients DMD et est relativement peu malade (espérance de vie équivalente à celle d'une souris saine).
- Le chien GRMD présente des lésions tissulaires proches et une évolution semblable à la maladie retrouvées chez les patients DMD, mais reste un modèle de gros animal coûteux et lourd à manipuler. Enfin, l'établissement de cohortes statistiquement significatives est quasiment impossible.

En 2014, un consortium de laboratoires a généré un nouveau modèle animal de la DMD : le rat DMDmdx. Cette lignée de rat, qui a été totalement caractérisée, se révèle être un très bon reflet de la pathologie humaine (atteintes supérieures à celles observées chez la souris mdx, comparables voire meilleures et plus reproductibles que celles observées chez le chien GRMD). Le rat, qui est 10 fois plus gros que la souris, reste malgré tout un modèle de petit animal de laboratoire qui est bien connu et qui ne présente pas les limites du modèle canin.

Notre projet vise à maintenir une colonie de rats DMDmdx à partir de femelles porteuses et de mâles sains. Les rats mâles DMDmdx générés seront destinés à être inclus dans des études futures de thérapie génique, cellulaire ou pharmacologiques. Certaines femelles porteuses générées seront destinées à devenir à leurs tours reproductrices.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit :

- Réduction :

La détermination du nombre total d'animaux à inclure dans ce programme de reproduction a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience de précédentes reproductions menées pour des projets de thérapie génique chez le rat DMDmdx. Dans ce projet, afin de générer au maximum 150 rats mâles DMDmdx par an, nous estimons qu'il sera nécessaire de mettre à la reproduction environ 40 femelles porteuses et 40 mâles sains par an, soit un total de 400 animaux reproducteurs utilisés sur 5 ans afin de générer environ 750 rats mâles DMDmdx. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur les particularités de reproduction sur ce modèle et en considérant que la lignée générera des portées de taille standard.

- Raffinement :

Le bien-être animal passera notamment par :

- de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu
- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)
- l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou autre, ou euthanasie si pas d'autre alternative)
- Afin d'améliorer la réactivité du personnel animalier, une grille de score de la douleur sera mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.
- la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions (anesthésie et analgésie si nécessaire)

6396. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets pharmacodynamiques ou les effets indésirables potentiels de nouvelles molécules.

Le type d'études *ex vivo* envisagés intervient précocement dans le développement préclinique de candidats médicaments. Réalisées en grande majorité sur des animaux sains, ces études permettent une première sélection de molécules d'intérêt sur un tissu cible avant leur évaluation dans des modèles physiopathologiques *in vivo*, plus consommateurs d'animaux. Ces études permettent la quantification des effets pharmacologiques ou indésirables de différentes molécules pour les comparer sur différents paramètres. Elles ne s'inscrivent pas dans l'établissement de données de sécurité (toxicologie) avec lesquelles elles ne sont pas redondantes.

Les molécules testées par le biais de ce projet le sont majoritairement dans notre champ d'expertise que sont les pathologies de l'appareil génito-urinaire et de l'appareil digestif. Cependant, pour la nécessité de partenaires commerciaux, d'autres champs d'expertise peuvent être explorés occasionnellement.

Pour répondre à cet objectif, des rats, des souris ou des cobayes seront utilisés selon le schéma suivant :

- Traitement de l'animal par le(s) candidat(s) médicament(s). Dans certains cas, un traitement hormonal de l'animal peut être mis en place pour contrôler l'imprégnation hormonale de tissus de la sphère génitale.
- Sacrifice de l'animal et prélèvement de tissus pour réaliser des analyses *ex vivo* : analyses biochimiques, histologiques et/ou fonctionnelles. Les études fonctionnelles (en bains d'organes isolés) permettent de mesurer l'effet de molécules sur la contractilité de tissus musculaires cibles prélevés post-mortem. Les analyses biochimiques et histologiques peuvent permettre l'étude de l'expression d'un récepteur cible ou le dosage d'un neuromédiateur au niveau du tissu ou l'analyse de l'impact d'une molécule sur la morphologie d'un tissu cible.

Afin de répondre à cet objectif scientifique, le nombre d'animaux utilisés nécessaire sera de 1 000 rats, 600 souris et 800 cobayes (à raison de 8 à 10 animaux par groupe, le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester).

Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, différents types d'enrichissement pourront être ajoutés aux animaux, tels que :

- Des carrés de coton pur permettant aux souris de faire une nidation (uniquement utilisé chez la souris) ;
- Des bâtons à ronger permettant aux rats et aux souris d'assouvir leurs besoins de rongement et limitant les querelles entre les mâles.
- Des igloos ou des tunnels, permettant le jeu et le repos des animaux (rat et souris).
- Des huttes en polycarbonate, permettant aux cobayes de se cacher et/ou se reposer.

Un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets indésirables des traitements :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...),
- Vocalisation, tremblements...,
- Perte de poids élevée (mais < 20% du poids initial),
- Posture anormale (voûté ou déséquilibré pour soulager une zone douloureuse, démarche anormale, diminution des mouvements, prostration),
- Détection/présence d'une anomalie (plaie, pilo-érection...),

Dans le cas où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée (les observations s'effectuant le matin) et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait mis à mort. De même, si un animal avait une perte de poids supérieure à 20%, l'expérimentateur mettrait à mort l'animal.

6397. L'insuffisance cardiaque est une maladie fréquente (environ 500 000 personnes en France) et elle reste de mauvais pronostic malgré les progrès réalisés ces dernières années. En effet, même si les thérapeutiques disponibles améliorent les symptômes et diminuent la morbidité, elles n'ont pas d'impact réel sur l'évolution inéluctable de la maladie vers l'aggravation. La dépression et le déclin cognitif sont des comorbidités fréquentes de l'IC et qui alourdissent le fardeau de la maladie à la fois pour les patients HF et leurs aidants. La compréhension des mécanismes à la base du dysfonctionnement cognitif de l'IC s'avère difficile étant donné le caractère multifactoriel de la maladie. Ainsi, le déclin cognitif est souvent attribué aux désordres hémodynamiques perturbant la perfusion cérébrale ou est

imputé aux médicaments prescrits. Notre hypothèse est qu'il existe un axe cœur-cerveau utilisant des voies nerveuses encore mal connues dont l'origine se trouve dans le tissu cardiaque et qui projettent vers le système nerveux central. Pour comprendre comment le cœur peut directement influencer l'architecture et les fonctions cognitives cérébrales, nous disposons un modèle d'ischémie cardiaque induite chez la souris par la ligature d'une artère coronaire. Dans ce modèle, il existe des modifications de l'architecture du tissu cardiaque et des perturbations du fonctionnement des fibres nerveuses liant le cœur au cerveau ce qui le rend approprié pour l'étude de la communication entre ces deux organes et de la cinétique des anomalies cérébrales. De plus, nous avons un outil pharmacologique (la capsalaïne ou son dérivé, la résiniferatoxine) capable de débloquent spécifiquement les fibres provenant du cœur et projetant vers le cerveau.

Au total, 64 souris seront utilisées et réparties en deux cohortes comportant chacune deux groupes de 12 animaux. 16 souris supplémentaires permettront de faire face à la mortalité per- ou postopératoire probable, en particulier dans les groupes subissant une ischémie cardiaque.

Cohorte ischémie cardiaque :

- un groupe subissant une ischémie cardiaque seule (n=12)
- un groupe subissant une ischémie cardiaque associée à une dénervation pharmacologique cardiaque (n=12).

Cohorte sham:

- un groupe subissant une ligature coronaire fantôme seule (n=12)
- un groupe subissant une ligature coronaire fantôme associée à une dénervation cardiaque pharmacologique (n=12)

-

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

- L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et des potentiels effets indésirables des procédures sur leur état de santé global.
- L'expérience a été organisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en prenant en compte la mortalité post-chirurgicale.

6398. Le paludisme, également connu sous le nom de malaria, est une maladie infectieuse causée par le parasite *Plasmodium* transmis à l'Homme par piqûre d'un moustique infecté. Fléau économique et sanitaire, le paludisme constitue, avec plus de 600 000 morts par an, la première parasitose et la troisième cause de mortalité au monde après la tuberculose et le SIDA et touche principalement l'Afrique subsaharienne, l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud. Le neuropaludisme est une des plus graves complications du paludisme. Cependant, sa physiopathologie n'est pas encore bien cernée chez l'Homme à cause de la localisation cérébrale de ce syndrome, ne permettant que des études post-mortem. La mise en place des modèles expérimentaux est donc indispensable afin d'étudier la pathogénie de la maladie, les différents mécanismes physiopathologiques liés à cette pathologie et de tester de nouveaux traitements.

La plupart des études ont été menées et sont réalisées sur la souris. Cependant, le modèle «neuropaludisme souris» est très discuté voire critiqué aujourd'hui car il semble développer des signes très éloignés de la pathologie humaine. Dans ce contexte, il était indispensable de développer un modèle mimant plus la pathologie humaine lors d'une infection palustre. Il s'avère que le rat présente un intérêt particulier car il semble, à l'opposé de la souris, partager avec l'Homme des caractéristiques immunologiques dans le cadre d'infections parasitaires. Ce critère est d'autant plus important que les paramètres immunologiques ont un fort impact sur le développement du neuropaludisme.

Dans ce contexte et dans le respect de la règle des 3R, nous avons développé un modèle de neuropaludisme chez le rat qui présente une grande similarité avec le neuropaludisme Humain. L'objectif actuel de notre travail est de tester les molécules antipaludiques et de voir leur efficacité réelle sur ce modèle de neuropaludisme notamment au niveau cérébral. Pour cela nous envisageons l'utilisation de 40 rats pour une évaluation de la survie des animaux sans traitement (sur 2 expériences de 20 rats chacun). Pour chaque expérience de traitement un lot de 25 rats et de 24 souris sera utilisé. Chaque traitement sera répété en moyenne 3 fois par an. Nous estimons ainsi à 775 le nombre maximum total d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats tangibles à l'issue de notre projet qui durera 5 ans. Lors de ces expériences, les animaux seront soumis à une surveillance quasi permanente (toutes les heures entre 6h00 du matin et 20h00 dès infection et durant toute la procédure). Une grille de surveillance journalière est mise en place pour effectuer un relevé détaillé de l'état général de chaque animal et ainsi contrôler les points d'arrêt.

6399. Les maladies chroniques du foie sont très fréquentes. D'après les estimations, elles affectent 2,8% de la population générale en France et sont responsables de plus d'un million de décès par an dans le monde. La stéatose métabolique (communément appelée stéatose non-alcoolique [NAFLD]) est associée à la surcharge pondérale et au diabète de type 2. C'est aujourd'hui la maladie du foie la plus fréquente, avant même les hépatites virales chroniques ou la consommation excessive d'alcool. La mort des cellules du foie est ce qui conduit à la progression de toutes les maladies du foie vers la cirrhose et le cancer du foie. L'hypothèse que nous formulons dans ce projet est que la nécroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire programmée induisant de l'inflammation et contrôlée par la kinase RIPK3, est impliquée dans la progression des maladies du foie, et qu'une nouvelle stratégie thérapeutique dans ces maladies consisterait à bloquer la nécroptose.

Le projet vise à identifier la contribution de la nécroptose à la stéatose métabolique et une maladie biliaire rare, la cholangite sclérosante primitive (CSP), deux maladies pour lesquelles il n'existe pas à ce jour de traitement efficace, et qui ciblent des types cellulaires différents du foie. Pour ce faire, nous combinerons une recherche sur des modèles de stéatose métabolique et de CSP chez des souris génétiquement modifiées pour inhiber les voies de la nécroptose dans différents types cellulaires (hépatocytes, cholangiocytes et macrophages) avec l'analyse de souris sauvages commerciales obèses traitées avec des inhibiteurs de la nécroptose que nous avons récemment identifiés.

La perspective est de développer de nouveaux traitements pour prévenir la mort des cellules du foie et par conséquent réduire le développement des complications de type cirrhose ou cancer chez les patients atteints de maladies hépatiques.

Type d'animaux : Souris transgéniques invalidées/contrôles pour le gène d'intérêt dans différent contexte et souris sauvages commerciales pour une partie du projet.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 400 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Au cours de ce projet, un objectif de réduction du nombre des animaux engagés sera poursuivi avec insistance de par l'analyse des données générées en continu. De plus, une démarche constante de raffinement sera mise en œuvre grâce à l'amélioration permanente des conditions d'hébergement (enrichissement, soins, etc.) et des procédures décrites dans ce projet.

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

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

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

6400. L'évaluation de la sécurité oculaire d'un produit est la première étape majeure dans le développement d'un médicament.

L'objectif de ce projet est de tester la tolérance et la distribution oculaire de différents produits fournis par différents laboratoires pharmaceutiques ou biotechnologiques dans le but de les sélectionner pour les tester ensuite dans des études cliniques.

Ce projet comprendra une procédure expérimentale dans laquelle seront décrit les études de tolérance et la possibilité de suivre la cinétique du produit au cours du temps.

Ce projet nécessite le recours à l'animal puisqu'à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. Les espèces animales choisies ont une physiologie, une anatomie et un métabolisme permettant une extrapolation à l'homme des effets sur l'œil.

Pour ce projet nous utiliserons au maximum 37500 animaux (rats, souris et lapins) sur 5 ans. Il s'agit du nombre calculé nécessaire pour obtenir des résultats exploitables et tangibles. Les animaux seront de jeunes adultes.

Les examens cliniques *in vivo* et les administrations seront réalisés sur animal vigile nécessitant une légère contention douce. D'autres examens et certaines administrations nécessiteront une anesthésie générale très souvent mineure et/ou locale dans le but de faciliter les examens/administrations et afin d'améliorer le confort de l'animal.

L'ensemble de ces examens ainsi que les voies d'administrations sont pratiqués couramment chez l'homme dans un cabinet d'ophtalmologie ou chez l'animal en ambulatoire et en clinique vétérinaire.

Afin de minimiser l'impact sur le bien-être des animaux, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi adapté à l'espèce et auront un suivi quotidien. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces seront mis en place permettant de réduire une éventuelle douleur à son minimum.

Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

6401. Le produit étudié est un bio-pesticide de contact. L'objectif de ce projet est d'acquiescer chez les rongeurs (souris et rats) et les poules pondeuses des données en vue d'obtenir une autorisation de mise sur le marché de ce produit en tant que traitement antiparasitaire de l'environnement où vivent les animaux.

Les avantages de ce produit sont nombreux : diminution de la pression d'infestation par des parasites externes des animaux, diminution du risque de maladies liées à ces parasites, et présentent un intérêt très important par rapport aux dommages induits par

l'utilisation d'animaux pour ce projet (procédures de grade léger (absence de douleur ou souffrance, stress lié à la manipulation des animaux et lors de l'application du traitement) et faible nombre d'animaux).

50 souris, 50 rats et 108 poules pondeuses maximum seront utilisées pour ce projet sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3R's :

- Absence de méthode de Remplacement : aucun modèle non animal n'est disponible.
- Réduction : l'utilisation de l'animal a été minimisée en testant la tolérance d'une seule dose et en diminuant le nombre d'animaux contrôles
- Raffinement : aucune douleur ou souffrance n'est attendue. De plus, la Structure en Charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit constamment l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux. Par ailleurs, le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort (surveillance adaptée). Tous les animaux sont hébergés en groupe en présence d'enrichissement (matériel de nidification, perchoirs, etc.).

6402. Le but de cette étude est de prouver la supériorité de l'activité anti-tumorale de l'Aflibercept comparativement au Bevacizumab sur des xénogreffes de cancer colorectal humain HT-29 répondant à ces deux traitements.

Pour cela nous souhaitons effectuer un « switch » (remplacement) d'un traitement à l'autre lorsque les tumeurs atteignent entre 300 et 400mm<sup>3</sup>.

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 : Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir en final des résultats statistiquement satisfaisants. Les règles éthiques sont toujours respectées au cours de notre protocole et nous veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés.

Ces études ont déjà été mise en œuvre *in vitro* (remplacement) mais doivent également être étudiées *in vivo*, puisque l'environnement d'une tumeur est ici pris en compte. Ce qui n'est pas envisageable dans une boîte de culture cellulaire.

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

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 60 souris.

Nous espérons mettre en évidence que le traitement par l'Aflibercept permettra une diminution de la croissance tumorale plus importante que le Bevacizumab (résultat déjà confirmé dans de précédentes études) et que le changement de traitements permettra une stabilisation de la croissance tumorale (Bevacizumab vers Aflibercept).

Type d'animaux : Souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 60 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.

6403. Les cholangiocarcinomes (CCA) sont un type de cancer rare qui atteint le foie et les voies biliaires. A ce jour, seule l'ablation chirurgicale apparaît comme une thérapie efficace mais elle n'est envisageable que dans 20% des cas, avec sur 5 ans un taux de survie estimé entre 15-40%. La majorité des patients ne pouvant bénéficier d'intervention chirurgicale reçoit alors une chimiothérapie. En cas de progression tumorale consécutive à cette première ligne de traitement, il n'existe à ce jour pas de thérapie complémentaire approuvée. Par conséquent, l'émergence de nouvelles approches thérapeutiques est plus qu'attendue.

Les plasmas froids atmosphériques (PFA) sont des gaz faiblement ionisés, constitués d'électrons, d'espèces radicalaires et excitées et possédant des propriétés de champ électrique et de rayonnement. Les PFA constituent une stratégie physique innovante et

prometteuse pour le traitement des carcinomes puisque leurs capacités à réduire la croissance tumorale ont récemment été démontrées dans des études *in vitro* et *in vivo*. Cependant, le développement et l'efficacité d'une stratégie PFA sur les cholangiocarcinomes (CCA) n'ont pas encore été testés. La finalité du projet est donc d'évaluer l'efficacité de la thérapie PFA comme alternative à l'ablation chirurgicale ou comme approche complémentaire à des traitements conventionnels.

L'utilisation d'un canon endoscopique à décharges (également appelé plasma gun) permet raisonnablement d'espérer une régression significative de la taille des tumeurs, voire même une régression importante en combinant cette approche innovante à l'approche conventionnelle de la chimiothérapie. Par ailleurs, on peut s'attendre à un « effet sélectif » du plasma, c'est-à-dire qu'appliquer sur une zone présentant des cellules tumorales et saines, le plasma pourrait favoriser la mort des cellules cancéreuses sans endommager les cellules saines.

Type d'animaux : Souris (*Mus musculus*) modèle de xénotransgreffe chez la souris immunodéprimée Hsd:athymicNude-Foxnu

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 328 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal qui reste cependant indispensable. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicole (coton, maison, etc.).

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. En effet, les cellules en culture ne permettent pas d'appréhender le processus de progression tumorale dans sa globalité.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous mettrons en place une étude pilote réalisée sur des groupes de 3 individus afin de déterminer les conditions optimales du traitement qui sera ensuite appliquée sur les groupes expérimentaux constitués de 8 souris.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, 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.

6404. La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent. Ainsi nous participons à la formation pratique de nos étudiants en thèse par l'apprentissage de techniques simples: préhension, contention et injections simples.

Le présent projet concerne la formation du personnel à la manipulation du rat. Un autre projet concernera la souris.

Par ailleurs, il existe des rats factices sur lesquels nous nous entraînerons aux différents prélèvements et administrations avant d'utiliser des animaux vivants.

Enfin, afin de réduire au minimum le nombre de rats utilisés, dès que possible, les animaux servant aux formations proviendront d'autres projets terminés et de sévérité légère à modérée. Afin d'éviter de cumuler trop de procédures, les animaux ne seront utilisés que pour une seule formation. Ainsi un total de 60 rats sur 5 ans sera nécessaire,

Aucun dommage particulier n'est attendu au cours de ces formations, les procédures étant classées légères. De plus, les animaux seront observés quotidiennement afin de s'assurer de leur bon état général.

6405. L'expérience que nous voulons mener sur les animaux vise à répondre aux exigences des autorités de santé par rapport à l'utilisation des cellules souches adultes (CSA) chez le patient au cours d'opérations de chirurgies réparatrices et esthétiques. Ces expériences chez l'animal visent aussi à répondre aux nouvelles exigences réglementaires européennes. Il nous est demandé de déterminer le devenir de ces CSA, une fois réinjectées chez le patient, après leur traitement avec notre dispositif médical (DM) afin de valider à la fois l'innocuité et l'utilité de ces cellules injectées.

Notre DM, permet, à partir du tissu adipeux de patient d'isoler différentes fractions de ce tissu et notamment, les CSA et la matrice extracellulaire (une espèce de support du tissu adipeux). Ces deux fractions après traitement vont être réinjectées chez le patient dont elles proviennent, dans des zones anatomiques pouvant être différentes de la zone de prélèvement mais fonctionnellement identiques. Ceci afin de combler et réparer des défauts tissulaires car les CSA ont la capacité de donner différents types de cellules pouvant participer à la reconstruction des tissus.

Le modèle animal est nécessaire car il représente un « système intégré » par rapport aux modèles *in vitro* de co-culture ou de reconstruction de peau, dans le sens où les CSA peuvent évoluer « naturellement » et communiquer avec les autres cellules présentes dans l'environnement du lieu d'injection. De plus, le modèle animal nous permet de réaliser l'expérience sur du long terme (6 semaines) (comme l'effet recherché sur le (la) patient(e)), ce que ne nous permet pas de faire les systèmes *in vitro*.

Les souris nude sont nécessaires pour cette expérience car elles présentent l'avantage d'avoir un système immunitaire défaillant qui permet de tolérer la prise et la survie de cellules humaines lors de leur injection.

Nous répondons à la règle des 3R dans ses différents aspects :

- Remplacement : Une partie du projet scientifique, non présenté ici, utilise des procédures alternatives. En effet, nous avons des approches *in vitro* utilisant des co-cultures de cellules de peau avec les CSA sur matrice, qui nous permet de mimer en partie, ce que l'on veut reproduire chez l'animal.

Réduction : le nombre d'animaux a été défini selon ce que l'on retrouve dans la littérature pour des expérimentations au design similaire. Nous avons déterminé qu'il nous fallait 16 animaux par condition principale. Nous entendons par condition principale, le traitement spécifique de la matrice extracellulaire. Cette condition principale est divisée en trois sous conditions, que sont les différentes densités de cellules que nous voulons appliquer sur la matrice pour mimer ce que l'on retrouve chez les patients. De ce fait, la répartition des animaux est la suivante : cinq souris par sous condition (quatre souris « test » + une souris de réserve) ainsi qu'une souris nommée T0 qui sera la souris de contrôle pour les 3 sous conditions. Nous avons six traitements de matrice extracellulaire prévus et de ce fait, nous travaillerons sur quatre-vingt-seize animaux. Les rongeurs utilisés sont des animaux non consanguins pour mimer la population cible de patients concernés par notre DM. Lors du sacrifice, les organes ou parties d'organes non requis pour l'expérience en cours sont conservés pour d'autres utilisations éventuelles, constituant une bio-banque accessible à l'équipe, 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. Le bien-être animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'aide à l'alimentation en cas de besoin, l'enrichissement de leur environnement et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage).

La responsabilisation du manipulateur et le respect de l'animal nous conduisent à prendre en charge la prévention de la souffrance, notamment par l'application stricte de points-limites préalablement définis. De plus, la procédure expérimentale que nous allons mettre en œuvre minimise la douleur chez l'animal car tout se fera sous anesthésie générale.

6406. Les peptides natrirurétiques (PN) sont des hormones d'origine cardiaque jouant un rôle physiologique clé dans la régulation de la pression artérielle et de la volémie. Plusieurs études suggèrent que les PN jouent aussi un rôle majeur dans le contrôle du métabolisme énergétique. Un travail récent indique que ces peptides stimulent la thermogénèse dans les adipocytes humains et murins. L'activité thermogénique du tissu adipeux, en particulier du tissu adipeux brun, est négativement corrélée à l'obésité et au diabète de type 2. Cependant un rôle causal des PN dans le contrôle de la thermogénèse *in vivo* n'a pas été démontré à ce jour. L'objectif de ce projet est de montrer que les PN induisent la thermogénèse en activant le tissu adipeux brun qui produit la chaleur. Les régulations *in vivo* impliquées dans ce mécanisme ne peuvent être étudiées dans des cultures cellulaires et un modèle murin est donc irremplaçable. Nous comptons démontrer l'activation du tissu adipeux brun *in vivo* par une technique de PET-scan et marquage au 18-FDG. Ce projet nécessite l'utilisation d'au minimum 48 souris de souche C57Bl/6J mâles. L'ensemble des fondements de la règle des 3R sera appliqué dans ce projet. La planification des expériences sera organisée de manière à optimiser au maximum les études afin de réduire le nombre d'animaux en évitant la répétition des groupes contrôles indispensable à la validation des résultats mais aussi en multipliant les tests *ex vivo*, *in vitro* et *in silico* effectués à partir des prélèvements réalisés sur les animaux. 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. La surveillance des souris sera réalisée tous les jours en fonction des procédures utilisées, ceci permettant d'euthanasier les animaux en cas de comportements anormaux ou de souffrance (points limite : perte de poids, prostration, poil hirsute).

6407. Les *Yersinia* sont un genre bactérien comportant quatre espèces pathogènes pour l'homme:

- *Yersinia pestis* est l'agent de la peste, une des maladies infectieuses les plus sévères pour l'homme ; au sein du genre *Yersinia* cette espèce a pour réservoir des rongeurs et pour vecteur des puces hématophages. Non seulement la peste n'a jamais disparu, mais elle réapparaît actuellement dans des régions où on la croyait éradiquée. Depuis les années 2000, des épidémies de peste humaines se sont même produites dans des pays du bassin méditerranéen proches de l'Europe, comme l'Algérie, la Lybie ou la Jordanie, *Y. pestis* est la bactérie dont le pouvoir pathogène pour l'homme est probablement le plus élevé de toutes les espèces bactériennes connues, et pourtant les réponses de l'hôte spécifiquement inhibées par ce bacille ne sont toujours pas identifiées. *Y. pestis* représente également une des armes biologiques potentiellement les plus efficaces pour des actes bio-terroristes.

- *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica* sont deux espèces entéro-invasives qui s'établissent chez de nombreux animaux et l'homme. En France, depuis 3-4 ans, un nombre croissant de diarrhées se révèle être dues à ces deux espèces pour des raisons qui sont encore inconnues. Elles sont actuellement la 3ème cause la plus fréquente de diarrhées humaines en France et en Europe.

- *Yersinia wautersii* est une espèce très récemment décrite, dont le pouvoir « pathogène » n'est pas encore bien connu. Probablement « apparue » en Corée, cette espèce a récemment été isolée en Europe, ce qui suggère son expansion géographique.

Ce projet vise à identifier et caractériser les interactions de l'une ou l'autre de ces quatre espèces au sein du genre *Yersinia* avec les tissus de l'hôte (souris de laboratoire) leur colonisation plus ou moins rapide, et les dommages systémiques et locaux générés. Les résultats de cette étude nous aideront à acquérir une meilleure connaissance des processus rendant compte des dommages induits par l'une ou l'autre espèce chez un mammifère modèle et à mieux comprendre pourquoi et comment l'hôte peut ou non contrôler la population bactérienne en recourant à des processus inflammatoires réparables, donc transitoires. Ces connaissances sont essentielles à l'amélioration des méthodes thérapeutiques contre ces quatre espèces de *Yersinia* invasives.



La mise en œuvre du projet reposera sur le recours à 14900 souris sur 5 ans. C'est une valeur par excès, obtenue en considérant que toutes les pistes expérimentales seront suivies. L'estimation du nombre d'animaux utilisés permettra d'obtenir des résultats robustes et reproductibles. Elle correspond au nombre minimum nécessaire à un traitement statistique correct. Les souris seront intégrées dans trois procédures :

- (i) l'évaluation d'un phénotype global,
- (ii) la caractérisation des processus (a) pathologique et (b) immunitaire précoces, ce qui permettra d'éviter que ne soit atteint le degré de gravité sévère, et
- (iii) l'acquisition d'images également aux étapes les plus précoces.

Les souris seront maintenues dans un environnement sécurisé et protégé. Elles seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. L'infection intranasale sera effectuée sous anesthésie. Les infections par *Yersinia* peuvent être mortelles, et si des animaux atteignent les points limites définis, ils seront euthanasiés.

Les données obtenues devraient permettre de proposer de nouvelles interventions thérapeutiques et/ou préventives ciblant les bactéries et ou visant à rétablir les processus effecteurs et réparateurs de l'hôte qui pourraient avoir été inhibés.

6408. L'impératif d'une aquaculture durable conduit à orienter l'alimentation des poissons vers la substitution de la farine de poisson par des produits végétaux renouvelables. Toutefois, ce remplacement est limité par des niveaux trop faibles en méthionine dans les matières premières végétales. Il s'agit d'un acide aminé essentiel qui ne peut être synthétisé par l'organisme et qui doit donc être apporté par l'alimentation. De ce fait, l'ajout de la méthionine en quantité adéquate dans les aliments composés de farine végétale est essentiel afin d'assurer une croissance optimale chez les salmonidés.

Pour cela il est nécessaire de bien comprendre son rôle dans l'organisme. En effet, cet acide aminé intervient dans le fonctionnement même des cellules *via* des mécanismes moléculaires complexes non encore totalement élucidés. Récemment, il a été ainsi démontré que la méthionine exerce un rôle clef dans les processus de méthylation de l'ADN ou des protéines qui le structurent, les histones. Concrètement, il s'agit de l'apposition par des enzymes spécialisées de groupement méthyle (CH<sub>3</sub> : un atome de carbone et trois d'hydrogène) sur l'ADN ou les histones. Ces modifications influencent l'expression des gènes et sont reconnues comme des acteurs majeurs de régulation, à court et long terme, de nombreuses fonctions physiologiques. Malheureusement, les recherches dans ce domaine restent encore fragmentaires chez les poissons.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'étudier chez des truites arc-en-ciel, les conséquences métaboliques de deux semaines d'alimentation avec un régime modérément carencé en méthionine lors de leur premier repas. Outre l'analyse des conséquences de ces traitements alimentaires à court terme, les travaux ont également pour but de tester la notion de programmation nutritionnelle chez les poissons, c'est-à-dire d'évaluer la possibilité d'affecter à long terme le métabolisme des poissons par des traitements nutritionnels effectués dès les premiers stades d'alimentation.

Pour cela, 3 régimes différents seront testés sur des alevins de truites dès leur premier repas: un régime contrôle, un régime déficient en méthionine (l'objet d'étude) et un troisième régime carencé en méthionine et en choline, reconnu pour impacter spécifiquement la méthylation de l'ADN et des histones. Ce troisième régime permettra d'évaluer l'importance de ces processus dans les effets observés.

Suivant le protocole défini, des alevins de truites de 0.1g seront distribués dans 9 bassins différents (n=200 alevins/bassin) puis alimentés dès le premier repas avec les 3 régimes mentionnés ci-dessus pendant 2 semaines (n=3 bassins/régime). Après ces 2 semaines d'élevage, l'ensemble des lots recevra un aliment commercial pendant 6 mois (poids estimé: 60g). Au terme de ces 6 mois d'élevage, chaque lot sera divisé en deux et recevra pendant 3 semaines un aliment expérimental du type commercial (Control) ou un repas « test » de même composition que l'aliment control mais dont l'huile a été légèrement oxydée (situation communément rencontrée en élevage). Ce plan expérimental permettra ainsi de déterminer si l'alimentation des truites avec un régime carencé en méthionine lors des premiers repas induit des modifications persistantes du métabolisme intermédiaire et si ces modifications entraînent des réponses métaboliques différentes lors d'une perturbation nutritionnelle. Dans l'ensemble, les différents régimes sont modérés et n'affectent ni la survie, ni la croissance des poissons.

Nous prévoyons d'effectuer trois prélèvements au cours desquels les poissons seront anesthésiés dans un bain de benzocaïne à 30mg/L puis euthanasiés dans un bain de benzocaïne à 90-100mg/L. Un premier prélèvement sera effectué 2 semaines après le premier repas (n=225 alevins/régime) et servira à analyser (sur les alevins entiers) l'impact direct (à court terme) des différents régimes sur le métabolisme (composition biochimique globale des alevins, méthylation de l'ADN et des histones, expression des gènes et protéines du métabolisme intermédiaire et du système de protection antioxydant de la cellule). Un second prélèvement aura lieu en fin d'expérience (n=126 poissons/régime) afin d'analyser l'impact à long terme des deux premières semaines d'alimentation avec les régimes expérimentaux sur le métabolisme. Une fois euthanasiés, les poissons seront disséqués et différents tissus (foie, muscle, cerveau) prélevés. Outre les analyses décrites ci-dessus, nous mesurerons, sur les tissus prélevés, l'activation de plusieurs protéines impliquées dans une fonction cellulaire majeure du métabolisme appelée « Autophagie ». L'autophagie (du grec *αυτο* : « soi-même », et *φαγειν* « manger »), désigne la capacité des cellules à digérer une partie de leur contenu pour libérer de l'énergie en situation de déséquilibre ou carence nutritionnelle et/ou stress énergétique. Récemment, nos travaux ont permis de démontrer que l'alimentation de truites avec un régime déficient en méthionine affectait l'expression de gènes clés de l'autophagie. Nous proposons à présent (i) de préciser les mécanismes sous-jacents et (ii) de déterminer si ces effets s'accompagnent d'une modulation de l'activité même de l'autophagie. Pour ce dernier point, 36 poissons supplémentaires par régime seront prélevés après traitement (par injection intrapéritonéale) à la colchicine (qui permet de mesurer précisément l'activité autophagique) ou à l'eau (contrôle). Une étude réalisée au laboratoire sur des truites a montré que la quantité ainsi que la durée du traitement à la colchicine nécessaire à la mesure de l'activité autophagique n'a pas d'effet délétère pour les animaux et n'induit aucun stress observable.

Au total 1800 poissons seront donc nécessaires à cette expérience mais seulement 1161 poissons seront prélevés. Les poissons restants seront remis dans le circuit d'élevage traditionnel.

Ce projet se conforme entièrement à la règle des « 3R » : Remplacement : les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme intermédiaire) ne peuvent être observés qu'*in vivo*. Réduction : le nombre de poissons prélevés est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans les analyses antérieures. Raffinement : Aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants. Et aucune injection ne sera effectuée sans anesthésie.

6409. La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative incurable qui entraîne la perte progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives. La MA affecte plus de 35 millions de personnes dans le monde et, à cause de l'allongement de l'espérance de vie, son nombre devrait tripler en 2050. En France, plus d'1 million de personnes souffrent de la MA, et chaque année plus de 200 mille nouveaux cas de la MA ou d'autres formes de démences sont diagnostiquées ([www.alz.org/fr/](http://www.alz.org/fr/)). À présent, un effort à l'échelle mondiale est en cours pour trouver de meilleures façons de traiter la maladie, retarder son apparition et empêcher son développement, car sans études plus poussées, la MA continuera à être un énorme fardeau social et économique.

Moins de 5% des cas de la MA sont liées à des mutations génétiques, qui se caractérisent par une transmission héréditaire et l'apparition précoce de symptômes de la MA. La majorité des cas de la MA sont beaucoup plus complexes avec l'implication de plusieurs gènes augmentant le risque de développer les premiers symptômes de la MA à un âge plus avancé (en anglais « Late-Onset Alzheimer's Disease » ou LOAD). Jusqu'à récemment le seul facteur génétique de risque de LOAD était une forme spécifique de gène codant une protéine (APOE4) impliquée dans le métabolisme des lipides. Grâce aux techniques d'analyse des génomes entiers, plusieurs autres gènes ont été identifiés comme facteurs de risque de LOAD. Jusqu'à ce jour, les mécanismes qui sont perturbés par ces gènes ne sont pas connus. Nous proposons ainsi dans ce projet d'étudier chez le modèle murin le rôle de certains de ces gènes et leur impact sur la cognition au cours du vieillissement.

Nous allons effectuer des tests comportementaux ciblant différents types de mémoire et impliquant différentes aires du cerveau afin d'évaluer la cinétique de perte de mémoire chez les souris portant une mutation dans un des gènes identifiés comme facteurs de risque de LOAD. Cette étude permettra d'une part de mieux comprendre la physiopathologie de la MA, et d'autre part d'anticiper les risques de démences chez les patients porteurs en diagnostiquant de manière préventive les gènes impliqués dans le LOAD. Ils pourraient bénéficier de suivis cliniques adaptés et de traitements précoces pour décaler le plus longtemps possibles l'apparition des premiers symptômes.

Remplacement: Aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée car il repose sur l'étude du comportement animal.

Réduction : La totalité des expériences nécessiteront l'utilisation de 588 animaux (3 lignées x 84 souris et 2 lignées x 168 souris). Dans le but de maximiser les animaux produits et de prendre en compte une éventuelle dysmorphie sexuelle, nous utiliserons des mâles et des femelles.

Raffinement : Nous allons mettre au point et utiliser un nouveau dispositif de phénotypage comportemental, qui permet de réaliser des études longitudinales des capacités cognitives chez les rongeurs en habitat social. Grâce à l'automatisation, une intervention de l'expérimentateur est minimale, ce qui permet une réduction importante du stress chez les animaux au cours du test. La mise au point du système est importante, car certains protocoles peuvent servir comme un raffinement des tests de mémoire associative, comme le test de conditionnement à la peur, qui est à présent utilisé par notre équipe.

6410. Les calpainopathies sont des maladies génétiques rares et de transmission récessive et sont dues à des mutations d'une enzyme du muscle squelettique appelée calpaine 3. Ces pathologies se manifestent vers l'âge de 10-20 ans, touchent principalement les muscles proximaux des ceintures musculaires (scapulaire et pelvienne). Les muscles de la face, ainsi que les muscles respiratoires et cardiaques sont épargnés. Il n'existe pas de traitement à l'heure actuelle. Dans le cadre du développement de stratégies thérapeutiques pour le traitement des calpainopathies (déficience en Calpaine 3), seuls des modèles murins sont disponibles. Ces modèles ne permettent des analyses uniquement moléculaires, le phénotype des animaux (quel que soit les lignées) est très modéré. Nous avons donc entrepris de créer un modèle rat déficient en calpaine 3 ; les modèles rats précédemment réalisés sont plus sévèrement atteints (et plus proche de la pathologie humaine) pour les pathologies neuromusculaires (comme pour la dystrophine avec les rats mdx). Les animaux porteurs/hétérozygotes de la mutation ont été générés. Notre projet vise à établir une lignée de rats homozygotes pour la mutation dans le gène de la calpaine 3. Les rats générés permettront de réaliser une caractérisation des animaux par analyses histologiques et fonctionnelles (grip test, actimétrie et autre(s) évaluation(s) fonctionnelle(s)) à différents âges, et de déterminer si le modèle généré mime la pathologie humaine pour être utilisé dans des études futures.

Le projet est constitué de 3 étapes :

- Etape 1 : Elevage d'animaux homozygotes
- Etape 2 : Evaluation fonctionnelle non invasive (Grip test et Actimétrie) sur un suivi de 6 mois
- Etape 3 : Evaluation fonctionnelle (tests à adapter en fonction des résultats de l'étape 2) à 2 stades de la maladie. Le(s) test(s) seront réalisés dans un autre établissement utilisateur sous couvert d'une autre saisine de cet EU.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit :

- Réduction

La détermination du nombre total d'animaux a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience d'une étude similaire de caractérisation d'une lignée de rats. La constitution des groupes d'animaux devrait assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure.

Dans ce projet, ~300 animaux (la moitié des animaux étant sains, l'autre moitié étant déficiente en calpain 3) seront nécessaires pour réaliser l'étude pilote de caractérisation de la nouvelle lignée générée. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études, et en considérant que la lignée générera des portées de taille standard.

- Raffinement

Le bien-être animal passera notamment par :

- de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu
- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)
- l'instauration de points limites pertinents et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou euthanasie si pas d'autre alternative)
- Afin d'améliorer la réactivité du personnel animalier, une grille de scoring de la douleur sera mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.
- la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions (anesthésie et analgésie si nécessaire).

6411. Les cellules du système immunitaire jouent un rôle clé dans le contrôle de la progression tumorale et de la réponse aux traitements au cours des cancers. Parmi ces cellules, les macrophages représentent la population immunitaire majeure. Les macrophages peuvent changer de phénotype et de fonction selon les stades du développement tumoral. En effet, au cours de la progression tumorale, les macrophages basculent d'un phénotype anti-tumoral vers un phénotype favorisant la progression tumorale et les métastases. A ce stade tardif, les macrophages sont corrélés à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers et semblent ainsi représenter des cibles thérapeutiques intéressantes.

L'objectif de notre étude sera de mettre en évidence dans des modèles expérimentaux de cancers chez la souris, déjà décrits dans la littérature, les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des macrophages au cours de la progression tumorale. Nous rechercherons alors l'effet de différents agents pharmacologiques pouvant moduler les fonctions des macrophages afin de favoriser l'élimination du cancer. Différents modèles de cancers (hématologique, ovarien, colorectal et dermatologique) seront étudiés et nous permettront de comparer le rôle des macrophages et l'effet des traitements afin de proposer des thérapies ciblées selon le type de cancers.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet. Les mécanismes impliqués dans le développement des cancers sont complexes. Ainsi, cette étude permettra d'étudier dans leur contexte physiopathologique les macrophages, cibles thérapeutiques potentielles, et ne peut pas être mimée par une approche de culture cellulaire. Les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux en collectant le plus de données possibles. L'ensemble de cette étude comprendra 4992 souris. L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures sur l'état de santé global des animaux. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

6412. Le Roaccutane® (isotrétinoïne, 13-cis l'acide rétinoïque) est le seul traitement curatif de l'acné vulgaris, une maladie dermatologique chronique très fréquente. Toutefois, dans environ 4% des cas, l'utilisation d'isotrétinoïne est associée à la dépression et au suicide. Bien que la prévalence de ce phénomène suggère l'existence de facteurs de susceptibilité génétiques, l'origine des effets secondaires n'est pas connue ; il n'existe pas non plus d'outils de diagnostic ou pharmacologiques afin de les prévenir, outre l'utilisation d'antidépresseurs classiques. La dépression sévère, en plus d'être un effet secondaire important du traitement à l'isotrétinoïne, fait partie d'un grand groupe hétérogène de troubles dépressifs associés au stress, et constitue le premier poste de dépense en santé dans les pays à revenu élevé. Les traitements existants ne sont efficaces que dans 65% des cas et nécessitent plusieurs semaines avant de faire effet.

Nos données démontrent, dans le modèle animal, la pertinence des facteurs génétiques de susceptibilité à développer des comportements dépressifs sous isotrétinoïne. Notre projet a comme objectif : (1) d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires d'une telle susceptibilité et (2) de proposer des méthodes de prévention et de traitement de la dépression induite par l'isotrétinoïne, (3) de déterminer l'utilité de ces données pour le traitement de la dépression associée au stress. Dans ce but, nous allons utiliser des souris génétiquement modifiées (modèles pertinents pour démontrer la susceptibilité à la dépression) ainsi que des modèles animaux utilisés dans la recherche sur la dépression et sur la neuro-inflammation.

Les données obtenues auront une répercussion immédiate sur l'avenir du traitement de l'acné par l'isotrétinoïne mais aussi sur les perspectives de traitement de la dépression. Nous pourrions proposer: (a) des biomarqueurs de diagnostic de susceptibilité, (b) des méthodes pour prévenir ou traiter des comportements dépressifs dans des conditions pré-cliniques, (c) des traitements anti-inflammatoires utiles dans le traitement de la dépression mais aussi pour la prévention de la neuro-dégénérescence.

Il n'est pas possible de REMPLACER les modèles murins par un autre modèle animal dans cette étude pour deux raisons principales : (i) une analyse des fonctions cérébrales telle que la motivation ne peut se faire que chez un animal vivant ; (ii) la souris est notre modèle de référence car c'est dans ce modèle que nous avons identifié la susceptibilité génétique et pharmacologique à développer le comportement dépressif associé aux rétinoïdes. Dans une optique de raffinement nous avons identifié *in vitro* (cultures cellulaires et analyses moléculaires du matériel biologique provenant de la souris) les interactions protéiques qui peuvent être à l'origine des troubles dépressifs chez la souris. Afin de REDUIRE le nombre d'animaux utilisés dans cette étude nous allons: (I) utiliser des petits groupes d'animaux pour des expériences pilotes dont le résultat sera déterminant pour la continuation ou non de la série expérimentale en cours (la stratégie GO/NO-GO) et (II) nous utiliserons les mêmes animaux que pour les tests comportementaux pour certaines études de neuro-inflammation.

Au total maximum de 880 souris sera utilisé dans ce projet.

Enfin en vue de RAFFINER les procédures, les animaux feront l'objet d'un suivi adapté et de soins vétérinaires au besoin. De plus, toute procédure chirurgicale sera réalisée sous anesthésie générale accompagnée des médicaments anti-douleurs appropriés.

6413. Etude de l'impact d'un répulsif acoustique de daurade royale sur le bar Européen.

Ce projet vise à concevoir un répulsif acoustique pour les daurades royales qui sont de grandes prédatrices des élevages conchylicoles (huîtres et moules). Une première version de ce répulsif a déjà été élaborée et testée au cours d'un projet précédent. Outre l'ambition de développer un système à l'échelle semi-industrielle avec l'étude de nouvelles séquences acoustiques d'effarouchement et de le tester au sein d'élevages conchylicoles, l'objectif de ce projet est également d'intégrer une étude d'impact sur le milieu pour s'assurer de la non nocivité de ce système sur l'environnement.

Les ondes sonores interviennent dans un grand nombre de processus essentiels pour la vie marine : les larves et juvéniles de poissons et de crustacés utilisent les paysages acoustiques naturels pour choisir les habitats les plus aptes au développement de la vie et pour s'orienter vers ceux-ci. Les performances de certaines fonctions vitales telles que la métamorphose, la recherche alimentaire, le comportement face aux prédateurs et le métabolisme dépendent du niveau de bruit ambiant dans l'habitat. Ainsi les émissions intermittentes de basses fréquences (20-700 Hz) par le répulsif sont susceptibles de générer un stress pour les espèces environnantes. Les pêcheurs plaisanciers et professionnels ont exprimé des inquiétudes face au déploiement de ce système sur le littoral, inquiétudes auxquelles il est nécessaire d'apporter une réponse.

L'étude d'impact consistera en une étude expérimentale sur des bars d'élevage (*Dicentrarchus labrax*) menée en milieu semi ouvert (cage d'élevage) pour évaluer par des observations vidéo leur comportement et par des dosages de cortisol le stress généré par le répulsif acoustique.

Au total 3060 individus seront utilisés: 3000 juvéniles répartis dans deux cages (une témoin et une exposée) et 60 adultes répartis dans deux cages (une contrôle et une exposée). Les poissons du groupe exposé seront soumis au fonctionnement de l'effaroucheur pendant 48 heures sous surveillance vidéo puis certains seront soumis à une prise de sang (procédure 1). Certains poissons du groupe contrôle seront uniquement soumis à la prise de sang (procédure 1). Concernant la règle des 3R: Il n'est pas possible de Remplacer les animaux dans cette expérience qui fait appel à l'organisme entier. La Réduction, les effectifs des groupes ont été réduits en particulier pour les adultes (N=60) tout en maintenant des effectifs suffisants pour des analyses statistiques (18 individus x 2 conditions = 36 individus adultes soumis aux prises de sang). Pour les juvéniles, des effectifs plus importants sont nécessaires pour observer un comportement grégaire de nage en banc naturel chez l'espèce et seulement un sous échantillon de 60 individus sera soumis aux prises de sang. Enfin, concernant le Raffinement sera pris en compte par les soins apportés lors du maintien en cage avant, pendant et après l'expérience (nourrissage ad libitum avec observation attentive de la réponse à l'aliment des poissons et surveillance quotidienne des cages selon les standards de l'éleveur).

6414. Choisir un bon partenaire pour la reproduction contribue fortement au succès reproducteur d'un individu. Du fait de l'investissement différentiel entre les sexes, le choix du partenaire est principalement le rôle des femelles. Les modalités de choix sont diverses et on en distingue deux grands types : l'ensemble des femelles d'une espèce peuvent rechercher un même type de mâle ou le choix peut dépendre des caractéristiques de chaque femelle. Ainsi une femelle peut chercher un mâle qui lui ressemble ou qui au contraire diffère. Dans ce dernier cas la femelle recherche un mâle complémentaire d'un point de vue génétique et phénotypique. La sélection du partenaire en fonction de son système immunitaire a été abondamment étudiée en particulier chez la souris domestique. C'est aussi une espèce qui cause de très nombreux dégâts aux constructions humaines et aux réserves de nourriture. Diverses voies ont été élaborées pour réguler les populations invasives et une des modalités principales est d'utiliser un biocide bloquant la synthèse de vitamine K, facteur clef de la coagulation. Les molécules utilisées sont des Anti Vitamine K (AVK) et sont utilisées comme anticoagulants depuis plus de 50 ans. Leur mode d'action est de bloquer le recyclage de la vitamine K, les ressources en vitamine K s'épuisent et la mort intervient par hémorragie après quelques jours. L'utilisation de biocide sur les populations naturelles de souris a entraîné l'apparition de formes de résistance par mutation du gène *VKORC1* qui est une clef du mécanisme de recyclage de la vitamine K. Les souris possédant cette mutation sont donc plus résistantes aux AVK que les souris non mutées, et la forme homozygote mutée est plus résistante que la forme hétérozygote (mutée/non mutée). Le but de notre étude est de tester si les souris femelles sont capables de choisir leur partenaire en fonction de la complémentarité de leur patrimoine génétique, la conséquence de ce choix étant une amélioration de la résistance des descendants aux AVKs. Le test utilisé est un test de choix entre les odeurs corporelles de deux mâles différant par leur degré de mutation du gène *VKORC1*. L'étude sera réalisée indépendamment sur deux souches possédant des mutations différentes de *VKORC1* aboutissant à des résistances aux AVKs de force différente.

- Remplacer les modèles animaux. Le modèle animal, en l'occurrence la souris domestique, est l'objet d'étude et ne peut donc être remplacé. Les connaissances acquises sur cette espèce peuvent contribuer à améliorer la gestion des populations de cette espèce invasive.

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation : Pour chaque souche l'expérience nécessite 27 sujets femelles et 27 donneurs mâles, soit au total 54 femelles et 54 mâles. L'effectif de 9 animaux par groupe de comparaison permet d'avoir suffisamment de données pour mener à bien les analyses statistiques.

- Raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites. Il s'agit d'expériences sur le comportement n'entraînant pas de stress majeur pour les animaux. La mise en contact des femelles avec des odeurs de mâles est une situation naturelle et le maintien des mâles en cage individuelle pendant la période de prélèvement est impératif pour éviter des problèmes d'hétérogénéité due à la mise en place d'une hiérarchie. Compte-tenu de l'aspect bénin de la procédure expérimentale, les animaux pourront être conservés pour des études ultérieures.

6415. Au cours du développement post-natal entre la naissance et le début de l'adolescence, il existe une période de forte plasticité cérébrale, appelée période critique pendant laquelle les circuits du cortex cérébral sont profondément remodelés. La fin de cette période est caractérisée par la formation d'une matrice extracellulaire spécialisée, le « perineuronal net » (PNN), qui entoure une population spécifique de neurones inhibiteurs corticaux. Les traitements enzymatiques ou pharmacologiques qui mènent à une régression du PNN permettent de réinstaurer une période critique de plasticité corticale chez la souris adulte. Ces données suggèrent que le PNN est régulé chez l'adulte par l'activité des circuits corticaux et que l'accumulation du PNN bloque la plasticité corticale. Ce projet, subventionné par contrat ANR, vise à déterminer l'influence de l'activité des neurones inhibiteurs sur la synthèse et la dégradation du PNN.

Pour mener à bien ce projet, plusieurs expertises (*in vivo*, *ex vivo*, outils pharmacogénétique...) seront combinées afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés pour ce projet. Le modèle souris permettra d'étudier le réseau cortical et le lien physiologique entre les FS-PV et le PNN, ce que ni la modélisation informatique ni l'expérimentation sur cellules *in vitro* en culture cellulaire ne permettent encore. Grâce à l'utilisation de nouveaux outils la manipulation *in vivo* d'une population de neurone est possible en diminuant au minimum les gestes invasifs (administration périphérique de drogue) chez la souris.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet seront nés et élevés en captivité. Leur nombre a été réduit au maximum (112 souris) afin d'obtenir des données suffisantes pour répondre aux exigences statistiques des questions scientifiques posées. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettront de veiller au bien-être des animaux et un environnement enrichi sera fourni aux animaux (nid végétal).

6416. L'amélioration des traitements de maladies dues aux mycobactéries fait l'objet de recherches actives car certaines mycobactéries sont responsables de maladies graves, la plus connue étant la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Cependant, d'autres maladies telle que la lèpre (due à *Mycobacterium leprae*) ou l'ulcère de Buruli (due à *Mycobacterium ulcerans*) sont tout aussi invalidantes mais restent méconnues. Les traitements de certaines mycobactéries sont longs et l'observance par les patients est difficile à vérifier par le personnel soignant du fait de l'éloignement des centres de soins dans les régions d'endémie (Afrique principalement).

L'ulcère de Buruli, dû à *Mycobacterium ulcerans*, est la troisième maladie la plus fréquente causée par une mycobactérie après la tuberculose et la lèpre. C'est une maladie qui affecte principalement la peau. La bactérie est présente dans l'environnement mais dont le mode de transmission à l'homme reste à ce jour inconnu. Le diagnostic et le traitement précoces restent donc les seuls moyens pour réduire au maximum les invalidités à long terme.

L'ulcère de Buruli évolue de manière indolore. En effet, cette mycobactérie possède une toxine anesthésiante (la mycolactone) ayant un fort pouvoir immunosuppresseur au niveau local, ce qui permet à la maladie d'évoluer sans douleur ni fièvre.

Jusqu'à récemment, seul un traitement par voie chirurgicale avec excision des lésions permettait de traiter les ulcères. Depuis 2004, l'OMS recommande un traitement à base de deux antibiotiques : la rifampicine (par voie orale) et la streptomycine (par voie injectable). L'inconvénient de ce traitement est sa durée d'administration (2 mois), les effets secondaires engendrés par la streptomycine, mais aussi son mode d'administration, par voie injectable, qui peut engendrer la transmission d'autres maladies par voie sanguine.

La problématique des recherches sur l'ulcère de Buruli consiste donc à 1. Trouver des molécules actives contre *M. ulcerans* administrables de manière 100% orales ; 2. Réduire la durée de traitement ; 3. Réduire la fréquence d'administration des antibiotiques.

La mise sur le marché de nouveaux antibiotiques demeure assez rare de nos jours. Récemment, de nouvelles molécules ont cependant démontré *in vitro* des activités sur des infections cutanées (exemple de la Solithromycine (famille des macrolides) ou du Tédizolide (famille des oxazolidinones)). Les résultats d'activité de ces molécules étant encourageants, il est nécessaire d'évaluer celles-ci dans le cadre de maladies telles que l'ulcère de Buruli. Notre projet consiste donc en l'étude *in vivo* de nouvelles molécules sur cette bactérie selon un schéma expérimental défini. Nous utiliserons pour notre étude l'inoculation de la bactérie dans le coussinet plantaire de la souris. Cette méthode a démontré son efficacité depuis plus de 50 ans dans le modèle *in vivo* d'infection de la lèpre et est appliquée dans d'autres modèles d'infections cutanées telles que l'ulcère de Buruli.

Le schéma expérimental que nous utiliserons dans l'évaluation de nouvelles molécules est celui de la méthode dite « d'activité stérilisante » : après infection, les animaux sont traités pendant 4 ou 8 semaines puis laissés en observation sans traitement afin d'étudier l'apparition d'éventuelles rechutes. Un arrêt des traitements à 4 ou 8 semaines permettra d'étudier l'activité bactéricide pure des molécules. Cet arrêt de traitement sera suivi d'une période d'observation permettant d'évaluer d'éventuelles rechutes, ce qui permettra d'étudier l'activité stérilisante des nouvelles molécules.

Par an, au maximum, 5 nouvelles molécules seront testées en fonction des recherches menées sur les nouveaux antibiotiques. Des animaux témoins non traités permettant de voir l'évolution de la charge bactérienne ainsi que des animaux traités avec le traitement standard de référence (rifampicine-streptomycine) seront utilisés comme groupes de comparaison par rapport aux traitements avec les nouvelles molécules. 40 animaux seront infectés par groupe (excepté pour le groupé témoin non traité qui ne contiendra que 30 animaux) : 10 animaux seront traités 4 semaines, 10 animaux seront traités 8 semaines et 20 animaux seront traités 8 semaines puis laissés en observation pendant 28 semaines après l'arrêt du traitement pour observer les rechutes.

Au total, pour 5 molécules, 230 animaux sont nécessaires sur 1 an, auxquels il faut ajouter 40 animaux traités avec le traitement de référence et 30 animaux non traités, soit un total de 270 animaux. Sur 5 ans, le nombre total maximal d'animaux nécessaires à cette étude est donc porté à 1350 souris. La lignée de souris utilisée est la BALB/C/J. Les souris seront des femelles afin d'éviter tout problème de dominance des mâles.

Le développement de la maladie chez l'animal entraîne un gonflement du coussinet plantaire. Ce gonflement reste totalement indolore pour l'animal grâce à la présence de la toxine (mycolactone) de *M. ulcerans*. L'évolution de la maladie n'entraîne donc ni souffrance ni décès chez l'animal.

Pour établir nos procédures, en plus d'une bibliographie approfondie sur le sujet, nous avons pris en compte la règle des 3R :

- Remplacement : le modèle murin utilisé pour *Mycobacterium ulcerans* est le seul permettant une évaluation de l'activité des antibiotiques avant un essai chez l'homme. Il est dans ce cas impossible de remplacer l'expérience sur l'animal par une expérience *in vitro* ;

- Réduction : le nombre d'animaux proposé a été réduit au minimum indispensable nous permettant de répondre à la question posée après évaluation statistique et incluant le vieillissement normal des souris ;

- Raffinement : l'évolution de la maladie qui n'engendre aucune souffrance chez l'animal et l'enrichissement utilisé, permettent de limiter le stress chez les animaux.

6417. La transplantation rénale est le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale qui est un problème de santé publique. Pour pallier à la pénurie d'organes, les prélèvements de reins sur des donneurs décédés par arrêt circulatoire ont été développés dont la catégorie III de Maastricht qui correspond à une décision d'arrêt des thérapeutiques actives en réanimation. Mais ces greffons subissent des lésions d'ischémie-reperfusion importantes liées au manque d'oxygène qui peuvent conduire à la mort prématurée du greffon. Pour en améliorer la qualité, les greffons peuvent être conservés dans des solutions de préservation au froid ou mis sur une machine de perfusion. Lorsque que le greffon a été préservé dans une solution de façon prolongée, se pose la question de l'intérêt de le mettre secondairement sur machine de perfusion pour en améliorer sa qualité. L'objectif de ce travail est double. Premièrement mettre au point un modèle expérimental reproduisant les conditions de prélèvement des donneurs décédés de mort cardiaque par arrêt des soins afin d'obtenir des greffons rénaux ayant des lésions similaires à ceux rencontrés en pratique clinique. Deuxièmement déterminer si la perfusion secondaire du greffon sur une machine de perfusion après un long délai de conservation froide, permet d'améliorer la qualité du greffon en diminuant les lésions d'ischémie reperfusion et en améliorant la fonction rénale.

Nous utiliserons un modèle de transplantation rénale chez le porc reproduisant les conditions d'un arrêt cardiaque programmé comme ce qui se passe en pratique clinique à savoir une baisse prolongée de la pression artérielle.

Premièrement nous validerons le modèle porcin de mort cardiaque par limitation des soins. Sous anesthésie et analgésie, nous reproduirons la phase qui survient après l'arrêt des soins par des médicaments qui baissent la pression artérielle et diminuent la fréquence cardiaque. La mort de l'animal sera confirmée par un électroencéphalogramme.

Deuxièmement afin de déterminer l'intérêt de la perfusion secondaire, nous constituerons 6 groupes :

- Groupe 1 : conservation pendant 20h dans une solution froide
- Groupe 2 : conservation sur machine pendant 20 h ;
- Groupe 3 : conservation dans une solution froide pendant 20h puis 4h de conservation sur machine de perfusion.
- Groupe 4 : conservation sur machine pendant 20h puis 4h de conservation dans une solution froide
- Groupe 5 : conservation pendant 24h dans une solution froide
- Groupe 6 : conservation sur machine pendant 24h.

En utilisant le modèle validé antérieurement, les greffons seront prélevés après confirmation de la mort de l'animal et conservés selon le groupe. Ils seront transplantés sur un sujet à qui on aura retiré les deux reins pour pouvoir évaluer la fonction rénale de façon simple par la mesure de la créatininémie.

Ce projet prend en compte la règle des 3R. Cette étude des lésions d'ischémie reperfusion ne peut être remplacée par des modèles cellulaires en raison de la complexité des mécanismes induits par la transplantation rénale, de la nécessité d'une vascularisation permanente de l'organe et de l'étude de marqueurs sanguins et urinaires. Le porc a été choisi car l'anatomie rénale porcine est proche de celle de l'homme et leur taille et poids permettent d'avoir un modèle préclinique proche des conditions humaines. 70 porcs au maximum seront utilisés entre les groupes expérimentaux, les donneurs dont les deux reins seront utilisés et les porcs pour le modèle de mort cardiaque. Le raffinement de cette étude a également été pris en compte en hébergeant les animaux dans des locaux adaptés à proximité de leurs congénères permettant de les voir et les sentir. De plus, la chirurgie ainsi que le traitement anesthésique et analgésique a été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire au minimum la souffrance des animaux, et une surveillance quotidienne des animaux permettra d'évaluer et d'adapter au mieux la prise en charge, en particulier pour le traitement analgésique.

Nous espérons montrer que la perfusion secondaire par machine après conservation statique longue permet de diminuer les lésions d'ischémie-reperfusion et d'améliorer la fonction rénale. Après des études chez l'homme, le but est d'intégrer cette perfusion secondaire dans la pratique quotidienne pour améliorer le bénéfice de la transplantation.

6418. *Mycobacterium leprae* est la mycobactérie responsable de la lèpre. La particularité de cet agent infectieux est son incapacité à croître *in vitro* par les méthodes conventionnelles de culture de bactéries que ce soit en milieu solide ou liquide. La seule façon d'obtenir une croissance bactérienne de *M. leprae* est le passage chez l'animal par une méthode d'inoculation de la bactérie dans le coussinet plantaire de la souris. Cette inoculation n'entraîne aucune altération de l'état général de l'animal ni aucune souffrance, tout en permettant d'obtenir des bacilles viables, nécessaires aux études scientifiques visant à trouver de nouveaux traitements antibiotiques.

En effet, l'amélioration du traitement de la lèpre est une nécessité car celui-ci est long et contraignant. Le traitement recommandé consiste en une polychimiothérapie à base de trois antibiotiques (rifampicine, clofazimine et dapsone) qui dure de 12 à 24 mois en

fonction du cas clinique de la maladie. Une mauvaise observance de ce traitement par les patients peut conduire à une émergence de souches résistantes aux antibiotiques utilisés et aboutir à un échec thérapeutique.

Notre projet consiste à maintenir des souches de *M. leprae* viables chez l'animal, souches qui seront nécessaires par la suite pour des expériences d'évaluation de traitements antibiotiques et qui feront l'objet de demande d'autorisation de projet séparé le cas échéant.

Nous possédons 9 souches de *M. leprae* dans notre collection : 5 souches sensibles aux antibiotiques et 4 souches qui possèdent différents phénotypes de résistance aux différents antibiotiques utilisés (résistance à la rifampicine, la dapsonne ou aux fluoroquinolones). Les différents phénotypes de résistance se comportent de la même manière qu'une souche sensible aux antibiotiques et n'entraînent donc pas d'effets secondaires chez l'animal. Afin de maintenir ces souches viables chez l'animal, chaque souche sera inoculée à 8 souris femelles NUDE NMRI (lignée qui permet d'avoir un nombre important de bacilles viables) dans le coussinet plantaire (= 72 souris). Au total, sur 5 ans, 360 animaux seront nécessaires.

En plus de ne pas être cultivable *in vitro*, *M. leprae* à un temps de développement très long pour obtenir une charge bacillaire suffisante pour des études futures (environ 12 mois). Les souris seront donc gardées en stabulation pendant cette période sans autre procédure expérimentale.

Pour établir nos procédures, nous avons pris en compte la règle de 3R :

- Remplacement : *Mycobacterium leprae* n'étant pas cultivable *in vitro*, le modèle murin est le seul permettant une culture bactérienne grâce à la méthode d'inoculation dans le coussinet plantaire ;
- Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum indispensable permettant d'obtenir une croissance des souches de *M. leprae* sur 12 mois ;
- Raffinement : quels que soient les phénotypes de résistance inoculés, l'évolution de la maladie n'engendre aucune souffrance chez l'animal et l'enrichissement utilisé permet de limiter le stress.

6419. Pour valider l'intérêt d'interventions nutritionnelles ciblées identifiées *in vitro* comme étant protectrices pour le métabolisme du foie en situation d'obésité et de diabète de type 2, deux types d'intervention nutritionnelle seront testés dans des modèles d'obésité chez la souris C57/BL6 et la souris Ob/Ob : une approche sera basée sur des acides aminés, l'autre sur des lipides. Selon les connaissances actuelles, il est peu probable que ces modifications du régime aient des effets indésirables sur la santé et le bien-être des animaux. Nous réaliserons des protocoles d'intervention nutritionnelle avec des régimes riches en lipides, dont des effets indésirables sont peu probables. Les modèles animaux utilisés dans ce travail sont nécessaires pour cibler au plus juste les mécanismes d'action dans le foie et pour comprendre les conséquences sur la santé de l'organisme. Aucun modèle non-animal n'est disponible pour ce projet.

Pour répondre à nos objectifs, nous utiliserons 840 souris.

Le nombre d'animaux a été estimé au minimum nécessaire pour satisfaire les analyses statistiques. Toutes les mesures sont prises pour éviter la souffrance animale et pour respecter la règle des 3R. Les animaux sont anesthésiés à la kétamine.

6420. L'introduction des nanomédicaments en médecine, où le médicament est incorporé dans un matériau appelé vecteur pour le transporter au site d'action, a révolutionné la formulation pharmaceutique en permettant l'émergence de nouveaux traitements avec une spécificité et une efficacité accrues. Ainsi, le défi des nanomédicaments réside dans : i) le contrôle de la distribution et libération du principe actif, avec notamment le transport spécifique de la molécule active à la cellule ou au tissu malade, évitant ainsi les effets secondaires pernicieux sur les tissus sains ; ii) la protection de la molécule active vis-à-vis de la dégradation dans la circulation sanguine.

Bien que des premiers nanomédicaments soient déjà sur le marché, ils sont peu nombreux car d'importants verrous technologiques demeurent tels que leur faible capacité d'incorporation du principe actif, sa libération rapide ou encore une toxicité importante.

Ce projet de recherche s'insère dans un projet plus vaste pour développer des nouveaux nanomédicaments plus sûrs sur le plan toxicologique et plus efficaces sur le plan pharmacologique. En effet, un nouveau type de nanomatériaux à base de carboxylates de fer poreux a été récemment proposé, dont les capacités d'incorporation des principes actifs d'intérêt majeur (antitumoraux, antirétroviraux et antibiotiques) se sont révélées exceptionnelles (jusqu'à 40 fois supérieures à celles des vecteurs déjà connus) avec des libérations progressives, et en prime des propriétés en imagerie médicale. De plus, des études déjà publiées chez le rat n'ont montré aucun signe de toxicité lorsqu'ils sont administrés à des doses très importantes. En conséquence, ces nanomédicaments semblent être une alternative très prometteuse pour la biomédecine et il serait intéressant de les tester sur différents types de cancer. L'évaluation de l'efficacité anticancéreuse de ces nanomédicaments doit être précédée par la détermination de la dose maximale tolérée. Cette étude est fondamentale car elle permettra de déterminer la dose maximale que l'on pourra utiliser ultérieurement dans des études d'évaluation de l'activité anti-cancéreuse, en étant sûr de ne pas passer à côté d'un effet à cause d'une dose trop faible. C'est la dose qui n'induit aucune mortalité avec une perte de poids inférieure à 10%. C'est un préalable à la bonne conduite des expérimentations à venir. Les études de toxicité doivent être finalisées *in vivo* afin d'évaluer la toxicité de la nouvelle molécule dans un organisme entier, toxicité qui est liée à son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination. Cette chaîne de phénomènes complexes découle d'interactions vasculaires, tissulaires, cellulaires et moléculaires. Elle ne peut pas être mimée *in vitro*.

L'objectif de ce projet est de déterminer la dose maximale tolérée de nanoparticules à base de trimesate de fer (MIL-100(Fe)) qui ont été modifiées en surface afin de leur conférer des propriétés intéressantes, telles que la furtivité (non reconnaissance par le système immunitaire), l'imagerie ou encore le ciblage. Les souris recevront une dose du nanomédicament et seront suivies sur une semaine (aspect général, poids).

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre d'animaux. Une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude.

Le bien-être des animaux sera pris en compte. Les animaux seront observés et évalués tous les jours et l'étude sera stoppée à partir de points limites précoces qui auront été fixés au préalable. Ils seront hébergés en groupe et bénéficieront d'un environnement enrichi.

Pour la réalisation de cette étude le nombre total d'animaux est estimé à 252 souris maximum sur 5 ans.

6421. Le projet de recherche consiste à tester de nouvelles formulations vaccinales basées sur l'utilisation de liposomes, complexés à des agents immunostimulants, permettant l'encapsulation de protéines antigéniques ou de séquences d'ADN codant l'antigène. L'efficacité de ces préparations vaccinales dirigées contre les infections à staphylocoques dorés sera évaluée chez la souris par l'analyse des réponses humorale (production d'anticorps) et cellulaire (activation lymphocytaire spécifique du pathogène) suite à la vaccination transcutanée.

La bactérie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est responsable d'intoxications alimentaires et de nombreuses infections supprimées chez l'homme et l'animal par leur capacité à infecter les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses. Dans le domaine agricole, elle est notamment le principal agent responsable de la mammite bovine, impactant la production laitière dans le monde, la qualité du lait et conduisant au décès prématuré des nouveau-nés. Le contrôle des infections à *S. aureus* par de nouvelles méthodes de vaccination constitue donc un enjeu majeur en médecine vétérinaire, d'autant que les vaccins actuels, qui utilisent des adjuvants classiques, n'induisent pas une protection satisfaisante des animaux contre le développement des mammites. Ainsi, nous avons développé de nouveaux complexes vaccinaux dans lesquels les antigènes protéiques ou leurs séquences d'ADN sont encapsulés sous la forme de liposomes et associés à des composés immunostimulants tels que les motifs CpG mon-méthylés des bactéries et/ou des résidus mannose des parois bactériennes. Ces préparations vaccinales sont destinées à être administrées par voie transcutanée, la peau constituant un site de choix pour le développement d'une réponse immune spécifique efficace. Cette réponse immune met en jeu à la fois une production d'anticorps spécifiques (réponse humorale) et le recrutement de cellules présentatrices d'antigènes au niveau cutané pour l'activation de lymphocytes spécifiques (réponse cellulaire). Afin d'analyser ces réponses dans un système intégré, seul un modèle animal permettra d'évaluer l'efficacité de ces nouveaux vaccins puisqu'il n'existe pas de méthode alternative *in vitro*. La réponse humorale sera suivie par le dosage d'anticorps spécifiques dans le sérum des souris immunisées et la réponse cellulaire sera déterminée au niveau cutané suite à l'isolement des cellules immunitaires infiltrant la peau au site d'injection du vaccin et au niveau des ganglions drainants pour leur caractérisation phénotypique et cytokinique en cytométrie en flux.

Concernant le respect de la règle des 3R, cette étude *in vivo* utilise la souris, une espèce couramment utilisée en vaccinologie. Son système immunitaire et ses réponses humorales et cellulaires ont été largement décrits depuis de nombreuses années, font référence dans le domaine et évitent d'avoir recours à des espèces mammifères plus proches de l'homme ou d'espèces bovines. Le nombre maximal de 360 animaux inclus dans l'étude, et présenté dans ce dossier, a été déterminé de manière à pouvoir tester toutes les combinaisons d'antigènes (de nature protéique ou ADN) et d'agents immunostimulants (motifs CpG et/ou résidus mannose). Néanmoins des essais préliminaires seront effectués et permettront de sélectionner, sur la base de la réponse humorale anticorps, la ou les combinaisons les plus efficaces, pouvant conduire ainsi à une réduction importante du nombre de conditions expérimentales à tester, et donc du nombre d'animaux à inclure, pour les analyses cellulaires. La notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation et d'élevage qui sont optimisées (hébergement en groupe, nid, enrichissement...) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales. Dans le but de réduire au maximum le stress de l'animal et la pénibilité des expériences (rasage du dos et injections/prélèvements nécessitant l'immobilité des animaux), une anesthésie sera systématiquement effectuée. Enfin, un suivi quotidien des animaux pendant la durée des expériences permettra de détecter les comportements douloureux chez les animaux, déclenchant la mise en place d'un traitement analgésique ou leur euthanasie.

6422. Les lymphomes T sont des pathologies rares et graves encore assez mal caractérisées. Certains lymphomes sont associés à des infections chroniques. C'est le cas de *Borrelia burgdorferi*, bactérie responsable de la maladie de la Lyme, qui semble être retrouvée dans certains lymphomes T cutanés.

Nous avons donc développé un modèle de souris susceptibles au développement de lymphomes T, et montré que l'infection par *Borrelia* augmente l'incidence d'un type particulier de lymphome T identifié au laboratoire.

Nous devons à présent démontrer que le développement de ces lymphomes dans notre modèle est bien dû à une infection chronique, une persistance de la bactérie *in vivo*, et vérifier l'effet de l'infection sur la biologie des lymphocytes T. Pour cela, nous voulons :

- Infecter comme précédemment nos souris modèle avec des *Borrelia* vivantes, et éradiquer la bactérie par traitement antibiotique à un temps précoce d'infection (J7), en faisant l'hypothèse qu'une courte infection ne sera pas suffisante pour induire une augmentation des lymphomes, de par l'absence de chronicité.

- Infecter des souris avec *Borrelia* et observer la prolifération et l'activation des lymphocytes T.

- Etudier la persistance des *Borrelia in vivo* dans notre modèle.

Les mécanismes de transformation étant complexes, le modèle animal est un outil indispensable et ne peut pour l'instant pas être remplacé par des modèles *in vitro*. Un ensemble de mesures seront mises en place afin de limiter au maximum toute souffrance animale (mesures antalgiques appropriées et mise en place de points limite), et un nombre minimal d'animaux sera utilisé afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables (nombre d'animaux utilisés : 98).

Ces résultats, en association avec nos expériences précédentes, devraient confirmer notre hypothèse selon laquelle les lymphomes sont bien induits par une activation chronique des lymphocytes, et nous conforterait dans l'idée que *Borrelia* puisse être impliquée



dans le développement de lymphomes T chez l'homme. Nous pourrions alors envisager leur traitement par antibiothérapie, comme c'est déjà le cas pour les lymphomes gastriques associés à l'infection par *Helicobacter pylori*.

6423. Le syndrome d'Ehlers-Danlos peut être défini comme un groupe hétérogène de maladies génétiques du tissu conjonctif caractérisées par des manifestations cliniques très variables affectant la peau, les articulations et les vaisseaux sanguins. Chez les patients, la peau est fine, vulnérable et hyper-extensible et présente des défauts de cicatrisation. Avec l'âge, ces symptômes deviennent un handicap important pour les patients et entraînent des souffrances et aucun traitement n'existe à ce jour. Dans la majorité des cas, ce syndrome est lié à des mutations sur les gènes de collagène. Notre projet de recherche porte sur l'étude de l'implication du collagène dans cette pathologie EDS où la peau est l'un des principaux organes touchés. Après avoir étudié la migration des fibroblastes en culture par vidéomicroscopie suite à la réalisation de blessures, mais aussi la cicatrisation *in vivo* chez des souris sauvages et transgéniques (qui sur-expriment le collagène dans la peau) nous souhaitons à présent tester si l'application de collagène en pansement directement sur la blessure pourrait améliorer la cicatrisation comme nous l'avions montré sur les fibroblastes de peau en culture.

Le protocole utilisé sera conforme aux exigences des 3R de la réglementation française concernant l'expérimentation animale.

Remplacement : aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux.

Réduction : pour chaque procédure, le nombre minimal d'animaux, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, sera utilisé.

Raffinement : les animaux seront hébergés à raison d'une souris par cage dans un environnement enrichi afin d'éviter le stress de la solitude. Un personnel qualifié s'assurera du bien-être des animaux au quotidien. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes seront observés quotidiennement et la procédure sera stoppée si l'animal présente des signes de mal-être.

Nous prévoyons d'utiliser au maximum 30 souris sur une période de 12 mois.

6424. La thématique de notre laboratoire est la recherche contre le cancer. Dans ce domaine, nous nous intéressons plus particulièrement à la capacité des cellules tumorales à utiliser une voie essentielle pour le recyclage des composants cellulaires : l'autophagie. Nous espérons qu'en inhibant l'autophagie, la croissance des tumeurs sera réduite ou inhibée.

Nous avons pu identifier une nouvelle classe de molécules activateurs de l'autophagie qui ont un effet antiprolifératif important dans quatre types de cellules cancéreuses distincts : du sein, du col utérin, du pancréas et du poumon. Au vu de ces résultats très encourageants obtenus *in vitro*, l'objectif de cette étude est d'examiner l'effet de deux de ces molécules dans la croissance tumorale et ceci dans quatre modèles *in vivo* de xénotransplantation de cellules cancéreuses (cellules cancéreuses dérivées du col de l'utérus, du poumon, du pancréas et du sein).

Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Il ne nous est malheureusement pas possible de remplacer notre projet *in vivo* par une étude *in vitro* ou *in silico* car les outils ne nous permettent pas de reproduire la complexité du phénomène étudié. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts, l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 476 animaux sur 3 ans.

6425. L'utilisation de cellules souches pour la réparation de tissus endommagés représente une des stratégies thérapeutiques entre les plus innovantes et le muscle squelettique est un tissu modèle pour le développement d'approches correctrices de thérapie cellulaire pour le traitement des maladies génétiques neuromusculaires, sa croissance et sa réparation étant effectuées par une population de cellules souches musculaires appelées cellules satellites. La régénération musculaire c'est le processus par lequel le muscle est capable de récupérer sa fonctionnalité après un dommage.

En effet la régénération musculaire est principalement étudiée chez la souris en analysant directement la régénération d'un muscle de souris avec tous les acteurs cellulaires murins. Le comportement des cellules satellites humaines ou encore des myoblastes humains (les cellules dérivées de la prolifération des cellules satellites) après la greffe reste un processus encore mal connu et des études *in vivo* sont nécessaires pour éclaircir plusieurs aspects.

Bien que la thérapie cellulaire représente une stratégie intéressante pour le traitement de certaines pathologies du muscle comme les dystrophies musculaires, nombreux paramètres (la survie, la prolifération et la migration des cellules injectées au sein de muscle de l'hôte) nécessitent des améliorations. L'utilisation de facteurs de croissance (comme par ex l'IGF1), capables de réguler la régénération musculaire, a été mise en évidence comme une stratégie possible pour améliorer la migration des myoblastes humains transplantés chez la souris.

Ce projet consiste à étudier l'utilité d'un facteur de croissance (obestatine) comme facteur thérapeutique pour améliorer la transplantation de cellules dans le muscle en vue d'un traitement pour certaines maladies musculaires. Plus précisément le projet consiste à étudier l'effet de l'obestatine sur des cellules musculaires (myoblastes) humains. Il s'agira d'injecter dans des souris immunodéficientes des cellules humaines traitées avec l'obestatine, afin d'évaluer si leur capacité à participer à la régénération musculaire est améliorée par rapport à l'injection de cellules musculaires sans traitement. Le choix d'un modèle immunodéficiente est indispensable puisqu'il s'agit de tester des cellules humaines dans un contexte pathologique. Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection intramusculaire. 15 souris immunodéficientes seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, pour chaque souris les deux TA gauche et droite seront injectés. Les

souris sont anesthésiées. Lors de la période post-opératoire les animaux recevront un analgésique. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur.

6426. La prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 est en constante progression dans le monde. Parmi les complications organiques de ces 2 pathologies, la stéatopathie d'origine dysmétabolique représente la première cause de maladie du foie, devant les hépatites virales et les cancers. Elle englobe un spectre de maladie allant de la stéatose hépatique simple (infiltration de graisse) au cancer hépatique en passant par des stades intermédiaires tels que la stéato-hépatite (inflammation et accumulation de graisse dans le foie) et la cirrhose hépatique (fibrose du tissu hépatique). Elle se développe en présence d'une insulino-résistance et/ou d'une obésité. La prévalence de la stéatopathie dysmétabolique chez les patients diabétiques de type 2 est très élevée (70%-80%), ce qui en fait un problème de santé publique majeur compte-tenu de sa gravité et de sa fréquence. De nombreuses études démontrent que l'inflammation du tissu hépatique au cours de la stéato-hépatite contribue à l'augmentation du risque de survenue d'un événement cardio-vasculaire des patients, augmente la résistance à l'insuline du tissu et favorise la progression de la maladie hépatique vers la cirrhose puis le cancer du foie. L'inflammation du tissu hépatique apparaît donc comme l'élément déclencheur permettant la progression de la maladie hépatique vers des stades plus délétères. Il existe donc un besoin urgent de comprendre les mécanismes inflammatoires dérégulés dans le cadre de la stéatose hépatique afin de pouvoir les contrôler.

Un autre tissu touché dans l'obésité et le diabète de type 2 est le tissu adipeux blanc qui joue aussi un rôle dans le développement de l'insulino-résistance. Il est d'une part le premier fournisseur d'acides gras libres qui vont être libérés dans la circulation et stockés de manière ectopique dans les tissus périphériques tels que le foie et d'autre part, le tissu adipeux des patients obèses ou diabétiques de type 2 se caractérise par une inflammation chronique à bas grade, responsable d'une diminution du signal insulinique au sein de ce tissu.

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription reconnu comme étant le chef d'orchestre de l'inflammation au niveau cellulaire. Des données de la littérature démontrent une augmentation de son activité dans les tissus métaboliques tels que le foie et le tissu adipeux blanc dans des modèles de souris obèses ou soumises à un régime riche en gras. Ces mécanismes inflammatoires ne sont pas complètement identifiés. Une des voies pour activer le NF- $\kappa$ B est le système RANKL/RANK, initialement décrit dans le système osseux mais son existence dans d'autres tissus a été rapportée ces dernières années (tissu mammaire, prostate, œsophage, ganglions, ...). Une étude a récemment proposé une implication de ce système dans le développement de la stéatose hépatique chez la souris. L'objectif de ce projet de recherche est d'investiguer les mécanismes de régulation de l'inflammation spécifiquement dans les tissus hépatique et adipeux murin et humain (hépatocytes, macrophages et cellules hépatiques stellaires pour le foie; adipocytes et macrophages pour le tissu adipeux). L'hypothèse que nous émettons est que ce système pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation du métabolisme des acides gras et de l'inflammation dans les tissus hépatiques et adipeux. Pour valider notre hypothèse, ce projet a pour but de déchiffrer les mécanismes moléculaires d'action et les fonctions physiologiques de ce système au sein de ces 2 tissus.

Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, dans le but de répondre à notre étude du rôle du système RANKL/RANK dans la régulation de voies de signalisation métabolique et inflammatoire au sein des tissus hépatique et adipeux, l'utilisation des modèles murins génétiquement modifié est nécessaire. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Le modèle murin est utilisé dans ce projet car les modèles génétiques ont été validés chez la souris. Les souris sont faciles à manipuler et la présence du centre d'explorations fonctionnelles sur le site nous permet d'utiliser ce modèle dans de bonnes conditions d'élevage. La souche C57Bl6 a été privilégiée car sa physiologie est connue et il est bien décrit qu'un régime obésogène et/ou diabétogène est capable d'induire une insulino-résistance quelques semaines après le régime.

720 souris seront nécessaires à notre projet. La règle des 3R sera appliquée : une souris servira pour plusieurs expériences (exemple : injection d'un adénovirus, challenge par un régime riche en gras, réalisation d'une OGTT puis d'une ITT, et sacrifice). Concernant l'inactivation de l'expression du récepteur RANK, à défaut de développer une nouvelle lignée qui accroîtrait le nombre d'animaux, nous avons fait le choix d'injecter un adénovirus combiné au gène de la Cre Recombinase qui invalidera l'expression de la protéine. Le bien-être des animaux sera vérifié par une personne compétente tout au long des procédures expérimentales. Des points limite seront appliqués et les procédures seront interrompues en cas d'attente de ces points limite.

6427. La carence d'organes actuelle conduit les transplantateurs à élargir les critères d'acceptations des greffons, permettant l'utilisation d'organes dits "marginiaux", provenant de donneurs âgés (60 ans et plus), et/ou présentant des facteurs de comorbidité, ou encore de donneurs décédés après arrêt circulatoire. Or les organes provenant de ces donneurs sont moins résistants face aux stress de la transplantation que les greffons "standards", ce qui se traduit par une augmentation des risques de complications post-greffe (retard de fonction, rejet aigu, complications à long terme). Il est donc important de proposer des protocoles de préservations plus adaptés à ces greffons marginaux, dont l'utilisation est en constante augmentation (près de 50% des organes transplantés à l'heure actuelle sont marginaux).

L'utilisation de machine de perfusion avec des solutions de conservation adaptées, permet une augmentation du degré de protection apporté à l'organe, et est recommandée pour les organes marginaux actuellement utilisés en clinique. Cependant, ce degré de protection reste insuffisant et il est important de continuer à développer cet outil afin d'améliorer son efficacité pour les organes de qualité décroissante.

Notre projet se propose d'évaluer le bénéfice d'une nouvelle solution de perfusion adaptée à la conservation par machine de perfusion sur un modèle rénal porcin.

Ce projet se déroulera en deux volets (effectif total: n=30+28):

i) Un volet *ex vivo*, permettant de tester plusieurs colloïdes dans la nouvelle solution de perfusion pendant la conservation machine à froid ( $\approx 20$ h à  $4^{\circ}\text{C}$ ) de l'organe (effectif *ex vivo*:  $n=30$ ) suivi d'une reperfusion sur banc en normothermie ( $37^{\circ}\text{C}$ ) pendant 2 heures. Lors de cette partie, nous pourrions utiliser des reins controlatéraux (témoins) provenant de porcs impliqués dans des projets parallèles afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés (3R: Réduction).

ii) Un volet *in vivo*, utilisant la solution de perfusion la plus performante de la partie *ex vivo*. La partie *in vivo* se déroulera par une conservation machine à froid ( $\approx 20$ h à  $4^{\circ}\text{C}$ ) de l'organe (effectif *in vivo*:  $n=28$ ) suivi d'une auto-transplantation du greffon rénal et d'une néphrectomie controlatérale chez le porc avec suivi à trois mois post-greffe. Un apport constant d'oxygène pendant la conservation *ex vivo* est une source d'amélioration de la qualité des organes, c'est pourquoi nous nous intéressons également aux effets d'un transporteur d'oxygène (M101) additionné à la solution de perfusion la plus performante (issue du volet *ex vivo*).

Le modèle de transplantation rénale chez le porc est un modèle préclinique mature, mis au point et utilisé dans notre laboratoire depuis plusieurs années. En premier lieu, l'expérience associée permet de démarrer les projets plus rapidement, sans utiliser d'animaux pour la mise au point de la technique de transplantation rénale (3R: Réduction).

De plus, la proximité physiologique, anatomique (et de taille/poids) du modèle porcin utilisé en fait un modèle de référence qui présente les avantages suivants :

i) possibilité de modéliser pertinemment des situations cliniques humaines en terme « médicaux » (anesthésie, chirurgie, etc.) et de prise en charge et suivi ; en corollaire, l'intérêt suscité auprès des praticiens/chirurgiens par un tel modèle expérimental assure une utilisation optimale des animaux (réduction des pertes et de la douleur (/mal-être) associé(e)s => 3R : Réduction et 3R : Raffinement) ;

ii) limitation de l'utilisation d'autres modèles animaux tels que des modèles murins (souris, rats => 3R: Raffinement, car plus directement exploitable à l'Homme) ;

iii) s'agissant du rein, l'anatomie rénale porcine est particulièrement proche de celle de l'Homme, ce qui en fait un modèle de référence pour les études à visée translationnelle en transplantation de cet organe (3R : Raffinement).

*Nota bene* : les modèles *in vitro* ne permettent pas de mimer de façon pertinente le processus complexe de la transplantation rénale ce qui implique une recherche ciblée sur l'organe (ex. perfusé) ou l'animal (transplantation). L'ensemble des procédures expérimentales est réalisé sous anesthésie-analgésie afin de réduire au minimum la souffrance de l'animal.

6428. Le trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) est un trouble qui se manifeste dès l'enfance et persiste à l'âge adulte dans environ 60% de cas. Ce trouble se caractérise par une perturbation de l'attention, une impulsivité verbale et motrice, parfois accompagnés d'hyperactivité. S'il n'existe à ce jour aucun traitement curatif, l'administration de psychostimulants améliore cependant l'état des patients.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur un gène de susceptibilité lié à l'autisme et au TDAH: le gène Scribble. La mutation du gène entraîne, chez la souris, une perturbation de l'apprentissage et de la mémoire qui s'accompagne la plupart du temps d'une hyperactivité ou d'un déficit important de l'interaction sociale.

Ce projet vise à tester sur nos modèles de souris les deux caractéristiques principales du trouble TDAH : 1) l'hyperactivité et 2) l'inattention ; puis l'efficacité de psychostimulants susceptibles de réduire les troubles observés. Nous utiliserons une lignée de souris mutante : la lignée « circetail ou crc » qui possède la mutation Scribble et une lignée de souris transgéniques « EMX-Scribble1 » où le gène Scribble est muté au niveau cérébral.

Notre projet repose sur une approche intégrée nécessitant le fonctionnement du cerveau dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous utiliserons autant que possible les mêmes animaux pour tester les différentes doses des molécules. Nous considérons qu'un nombre minimum de 15 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 380 animaux. Enfin, pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie, observés quotidiennement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place.

6429. Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les

procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immuno-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses à mener à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1992, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou dans la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer *in situ* comme immunogène et déclencher rapidement une réaction immunitaire. L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse *in vivo* de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylé. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire.

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire *in vitro* des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x10).

Le temps minimum d'immunisation est de 71 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une immunisation intramusculaire au niveau du muscle tibial antérieur sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

6430. La morphogénèse se définit par l'ensemble des transformations que subit l'embryon avant d'acquérir sa forme spécifique. Pendant la morphogénèse, les tissus changent de forme sous l'action de forces générées par les cellules qui les composent. Afin de mieux comprendre ces changements, nous avons développé des techniques permettant de mesurer les forces cellulaires qui façonnent l'embryon pendant le développement préimplantatoire des mammifères.

Le projet proposé vise à identifier les événements moléculaires et mécaniques mis en jeu pendant la morphogénèse de l'embryon de souris.

Les morphogénèses de l'embryon de la souris et de l'embryon humain sont extrêmement proches et son étude chez la souris nous apportera par conséquent de nouvelles perspectives quant à la compréhension de notre propre développement. Ceci aura un impact direct sur la médecine reproductive qui aboutit à plus de 13 000 naissances par fécondation *in vitro* chaque année en France (Agence de la Biomédecine).

Notre modèle d'étude est la souris car c'est un mammifère, comme l'homme, qui a un temps de gestation court et des capacités de reproduction élevées. Son génome est proche du génome humain et est parfaitement connu, ainsi que les outils génétiques pour générer des animaux transgéniques. Nous utiliserons des lignées de souris transgéniques pour différents gènes d'intérêt ce qui permettra l'étude du rôle de protéines spécifiques intervenant durant la morphogénèse. De plus, le modèle murin satisfait l'exigence d'utilisation de mammifères les moins susceptibles de ressentir de la douleur, de la souffrance ou de subir des dommages durables dans les conditions de la procédure expérimentale.

Nous avons estimé à 6182 le nombre d'animaux nécessaires et suffisants pour ce projet pour cinq ans.

Notre procédure expérimentale consiste à super-ovuler des femelles wild-type ou transgéniques, les accoupler avec des mâles et les sacrifier quelques heures à quelques jours après l'accouplement pour récolter les embryons au stade préimplantatoire.

Ces lignées transgéniques sont maintenues depuis plusieurs années et ne présentent pas de phénotypes dommageables. Nous utiliserons également des injections au niveau des cellules embryonnaires des blastocystes en culture pour diminuer l'expression de gènes cibles ou induire l'expression de protéines fluorescentes, réduisant ainsi la quantité de souris utilisée.

Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R:

Remplacement: La sélection des expériences pertinentes s'appuie sur de nombreuses expériences effectuées depuis de nombreuses années sur les mouches drosophiles, les vers nématodes, les poissons zèbres ou encore les cellules mammifères en culture. Cependant l'expérimentation animale permet d'étudier des processus mis en jeu dans le développement embryonnaire des mammifères qui ne peuvent pas être modélisés *in vitro* ou dans d'autres espèces animales.

Réduction: Nous induisons une super-ovulation des femelles pour augmenter le nombre d'embryons préimplantatoires récoltés et diminuer le nombre de femelles nécessaires. Cette procédure permet effectivement d'obtenir entre 20 et 30 embryons par femelle au lieu de 8 à 10 environ sans l'étape de super-ovulation.

Raffinement, par une manipulation minimale des animaux vivants. Afin d'éviter la génération de phénotypes délétères (provoquant des signes de souffrance et de détresse des animaux mutants), des systèmes inductibles ont été mis au point, qui permettent de générer ces phénotypes par injection au niveau des cellules embryonnaires directement. Les embryons injectés seront étudiés *in vitro* pendant la phase préimplantatoire de développement.

6431. Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie chronique caractérisée par une augmentation du taux de glucose dans le sang (hyperglycémie) provoquée par un défaut d'assimilation, d'utilisation et de stockage des glucides apportés par l'alimentation. Si en 2015, 415 millions de personnes étaient diagnostiquées diabétiques, les différents organismes de santé prévoient 642 millions de diabétiques en 2040. Pour l'OMS, le diabète deviendra la 7ème cause de décès dans le monde en 2030. Ainsi, le diabète de type 2 représente un enjeu majeur de santé publique. La physiopathologie du DT2 est caractérisée d'une part par la diminution de la sensibilité à l'insuline des tissus périphériques cibles (foie, tissu adipeux blanc, muscle squelettique) et d'autre part une détérioration progressive de la masse et de la fonction de la cellule  $\beta$  du pancréas, cellule productrice de l'insuline. Ainsi le DT2 est caractérisé par un ensemble de caractéristiques multifactorielles affectant différents organes. Il existe à l'heure actuelle peu de traitements efficaces contre l'insulino-résistance.

Les maladies chroniques du foie d'origine non alcoolique (NAFLD), quant à elles, sont considérées comme une maladie bénigne du foie et sont caractérisées par une accumulation de graisses dans le foie dans plus de 5% des cellules hépatiques (stéatose), en absence de toute consommation d'alcool / de médicament, d'hépatite liée à une infection virale ou une maladie auto-immune. Si la prévalence des NAFLD est de 25% dans la population mondiale, certains patients (~10-40% des personnes atteintes de NAFLD) développent une manifestation plus sévère de la stéatose : la stéato-hépatite d'origine non alcoolique (NASH) qui se caractérise alors par une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes, un ballonnement hépatocytaire et une inflammation pouvant aboutir à une fibrose. Dans les cas extrêmes, la NASH peut évoluer vers une cirrhose non alcoolique voire un hépato-carcinome. La mortalité chez ces patients atteints de NASH est d'environ 7% dans la population générale et peut atteindre 36% chez des personnes souffrant de maladies cardio-vasculaires. Actuellement, seules des modifications de comportement alimentaire et physique sont utilisées pour réduire l'impact des NAFLD/NASH, mais il n'existe aucun traitement thérapeutique.

L'objectif de ce projet est de caractériser des candidats médicaments dans des tests *in vitro* sur des cellules primaires isolées à partir d'organes ou sur des organes entiers isolés, prélevés chez des animaux sous anesthésie et sans réveil consécutif.

Afin d'évaluer leurs effets sur les fonctions impliquées dans les maladies métaboliques (pancréas, foie, muscle et tissu adipeux). L'intérêt de ce projet sera de pouvoir utiliser des animaux pathologiques pour contrôler l'effet des candidats médicaments sur les dysfonctions métaboliques de cellules primaires pathologiques et de vérifier la réversion de la dysfonction par rapport à des cellules primaires obtenues à partir d'animaux sains. De nombreuses lignées cellulaires existent pour les différentes fonctions impliquées dans le métabolisme (lignées de cellule  $\square$  pancréatiques, lignées d'hépatocytes, lignées de cellules musculaires ou adipocytaires). Cependant, celles-ci étant tumorales, elles présentent des fonctions métaboliques différentes de celles observées chez des cellules primaires, et elles ne présentent pas de phénotypes pathologiques associées à l'obésité, le DT2 et la NASH. Ainsi, ce projet permettra d'approfondir la compréhension des mécanismes d'action des candidats médicaments ainsi que des mécanismes impliqués dans les dysfonctions associées aux différentes pathologies en utilisant des cellules primaires ou organes d'animaux sains ou pathologiques. De plus, ces études sur cellules primaires peuvent être complétées pour des produits plus avancés par des études de fonction sur organes isolés, ce qui permet de conserver les interactions cellulaires et l'intégrité de l'organe et ainsi de vérifier le maintien de l'effet observé dans les cellules primaires sur l'organe entier.

Dans ce projet, les espèces rats et souris pourront être utilisées. Le choix de l'espèce (rat ou souris) sera orienté par 1) la validation de la présence de la cible du candidat médicament dans l'une ou les 2 espèces, 2) les caractéristiques métaboliques du candidat médicament (absorption intestinale, stabilité métabolique....) en fonction de l'espèce, 3) la puissance du candidat médicament sur sa cible selon l'espèce, 4) le modèle préclinique de dysfonction métabolique utilisé pour les caractérisations *vivo* du candidat médicament et 5) la quantité de produit utilisée pour les études. Les deux espèces de rongeur souris et rat utilisées dans ce projet seront hébergées en groupes sociaux tout au long des expérimentations, dans des cages enrichies respectivement de bâtonnet en bois à ronger, de tubes de cellulose, de litière adaptée à la pathologie et si nécessaire de tunnel ou de petite cabane. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que ronger, explorer ou encore nidifier. De plus, les animaux font l'objet d'une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi qu'une surveillance suivie de prise alimentaire et hydrique. Dans le cadre de notre approche de recherche de nouvelles molécules, nous utilisons un nombre minimum d'animaux. Dans ce projet, les animaux pourront provenir d'autres projets lorsque ces animaux n'ont pas été incorporés dans les études au moment de la randomisation. On estime entre 5 et 30 animaux maximum par étude en fonction du type d'analyse à réaliser et on pense réaliser 129 études par an, soit une prévision de 10000 animaux (rat et souris) pour toute la durée du projet.

6432. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre de personnes souffrant d'obésité était estimé à 600 millions en 2014 et 1.9 milliards de personnes étaient en surpoids. De façon inquiétante, 41 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou

obèses, soulignant l'importance du phénomène de l'obésité dans nos sociétés. Les conséquences de cette prise de poids excessive sont multiples et concernent entre autre les maladies cardiovasculaires, des troubles musculo-squelettiques, le diabète de type 2 (DT2) et les maladies hépatiques d'origine non alcoolique. Si en 2015, 415 millions de personnes étaient diagnostiquées diabétiques, les différents organismes de santé prévoient 642 millions de diabétiques en 2040. Pour l'OMS, le diabète deviendra la 7ème cause de décès dans le monde en 2030. Ces chiffres impressionnants démontrent l'enjeu majeur de santé publique de l'obésité et du diabète de type 2.

Le DT2 est une maladie multifactorielle, résultant de l'interaction entre des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs d'environnement (obésité, sédentarité, surnutrition...). La physiopathologie du DT2 peut schématiquement être résumée à deux anomalies : d'une part la diminution de la sensibilité des tissus-cibles (foie, tissu adipeux blanc, muscle squelettique) aux effets de l'insuline et d'autre part une détérioration progressive de la masse et de la fonction de la cellule  $\beta$  du pancréas endocrine, cellule productrice d'insuline. Du fait du caractère polygénique (impliquant plusieurs gènes) de la maladie chez l'homme, les modèles animaux utilisés dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements médicamenteux doivent présenter différentes facettes de la maladie ; il peut s'agir de modèles présentant une hyperglycémie et/ou une obésité et/ou une insulino-résistance. Le choix d'un modèle plutôt qu'un autre est réalisé en fonction du mécanisme d'action présumé du produit à tester et donc de la cible pharmacologique. Les régimes hyper lipidiques, considérés comme méthodes de référence pour générer des modèles d'obésité chez le rongeur et pour engendrer des pathologies similaires à celles rencontrées chez l'homme, génèrent des pré-diabètes avec hyper-insulinémie, insulino-résistance et légère intolérance au glucose mais rarement d'hyperglycémie sévère. Différents régimes « high fat diet » hypercaloriques peuvent être utilisés pour induire ces modèles d'obésité et pré-diabète. Leur composition diffère dans la part des lipides et/ou des carbohydrates, ou encore dans la teneur en cholestérol, modulant ainsi l'intensité des troubles métaboliques générés. Ces modèles représentent ainsi des modèles d'intérêt dans la recherche de nouveaux traitements médicamenteux pour les maladies métaboliques et peuvent être utilisés pour valider des cibles thérapeutiques, approfondir les connaissances sur les dysfonctions métaboliques, mais aussi pour réaliser des preuves d'efficacité des candidats médicaments.

L'objectif de ce projet sera ainsi d'utiliser des modèles d'obésité et de dysfonction métabolique induis par des régimes « high fat diet » pour approfondir nos connaissances sur des candidats médicaments que ce soit par des tests de caractérisation *in vitro* sur des organes ou cellules provenant d'animaux pathologiques, ou par des tests d'efficacité *in vivo* après un traitement aigu ou chronique. Cet effet *in vitro* ne peut pas être évalué sur des lignées cellulaires qui ne présentent pas d'état pathologique et qui, de plus, présentent des mécanismes modifiés. De plus, l'effet *in vivo* d'un produit sur le métabolisme glucidique et lipidique ne peut être évalué qu'après un traitement aigu ou chronique de plusieurs semaines chez l'animal et requiert la complexité d'un organisme vivant intégrant toutes les interactions hormonales et neuronales, ce qui n'est pas le cas sur des cellules ou organes isolés. Il n'y a donc pas de méthode substitutive.

On estime à environ 50 le nombre d'animaux par étude et on suppose pouvoir réaliser 20 études par an (soit sur 5 ans environ 5000 animaux).

Dans ce projet, les souris seront principalement hébergées en groupes sociaux tout au long des expérimentations. Les cages seront enrichies de bâtonnet en bois à ronger, de tubes de cellulose « cocoon », ainsi que d'une litière adaptée à la pathologie (polyurie due au diabète). Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que ronger, explorer ou encore nidifier. Pour certaines souches, les souris seront hébergées en cage individuelle pour permettre un libre accès à leur nourriture sans comportements sociaux (dominance...) et assurer le développement de la pathologie. Leur enrichissement sera dans ce cas complété de petites cabanes destinées à compenser l'absence de congénères. Tous les animaux font, de plus, l'objet d'une observation visuelle, comportementale quotidienne, ainsi que d'une surveillance de prise alimentaire et hydrique. Les techniques d'imagerie (dédiées à la quantification du tissu adipeux par exemple) sont non invasives et sans incidence sur le bien-être des animaux.

6433. D'après l'OMS, la prévalence de l'ensemble des affections neuropsychiatriques, est d'environ 13 % chez les adultes et ce chiffre va encore augmenter avec le vieillissement de la population.

Notre unité de recherche tente d'apporter de nouveaux traitements afin de soigner les maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson ainsi que les maladies psychiatriques comme la dépression, qui est celle la plus répandue dans la population. Pour être efficaces, ces traitements doivent atteindre le cerveau, seuil de ces maladies. Or le cerveau est naturellement protégé par une barrière, appelée la Barrière Hémato Encéphalique (BHE) qui, de par sa fonction protectrice, est peu perméable aux molécules d'origine exogène.

L'objectif de notre projet est de mesurer la capacité de nos candidats médicaments à rester durablement dans l'organisme avant élimination et surtout, de mesurer leur capacité à traverser la BHE afin de pouvoir agir localement.

Il existe des modèles de simulation de passage de barrière *in silico* ou *in vitro* (sur cultures de cellules) qui donnent une indication mais, n'étant pas prédictifs à 100%, ils ne permettent pas aujourd'hui de s'affranchir de l'administration des molécules sur l'animal. Des rongeurs (rats et souris) vont ainsi permettre de mesurer la concentration du produit dans leur sang et leur cerveau à différents temps (généralement deux) après administration de nos molécules par voie périphérique, le plus souvent par voie orale.

Dans notre processus de sélection des meilleurs candidats médicaments, le présent projet s'inscrit à la suite des tests d'efficacité *in vitro* et permet d'écartier des produits qui n'auront aucune chance d'être efficaces dans les tests pharmacologiques *in vivo*. Il permet donc de réduire le nombre de rongeurs à utiliser par la suite. Les traitements pharmacologiques seront réalisés en aigu sur la souris, qui est l'espèce utilisée dans les premiers tests d'efficacité *in vivo*: les tests d'efficacité chez le rat arrivent plus tardivement dans le processus de sélection de nos candidats médicaments. Le nombre d'études de passage de la BHE sur cette espèce est donc beaucoup plus faible que sur la souris. Par ailleurs, il est également envisagé dans ce projet de réaliser des vérifications de la présence d'un composé dans le sang et le cerveau après traitement chronique chez la souris. Dans ce cas, la pose d'une mini-pompe osmotique sous la peau, permettant de délivrer un traitement de manière chronique sur une durée déterminée et évitant l'administration quotidienne aux animaux, sera réalisée sous traitement anesthésique et analgésique.

Il suffit d'étudier un composé à une dose et deux temps post-administration à raison de 3 animaux par condition pour évaluer de façon certaine la capacité et la vitesse de pénétration de la molécule jusqu'au cerveau. Compte tenu du nombre de composés devant être testés, on peut estimer, sur la durée du projet (5ans), une utilisation d'environ 7200 animaux (5400 souris et 1800 rats) au maximum.

Tous les animaux de ce projet feront l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin. Ce suivi permettra d'identifier tout signe de souffrance et de soustraire les animaux des études en cas d'atteinte des points limites prédéfinis. Il sera accru pour les lignées de souris génétiquement altérées susceptibles de présenter un phénotype dommageable. Souris et rats disposeront d'un enrichissement de leur milieu adapté à leurs besoins, comme des 'cocoon' pour se construire un nid pour les souris ou encore des morceaux de bois à ronger pour les deux espèces.

6434. Depuis sa découverte en 2002, REDD1 apparaît comme une protéine de réponse à divers stress sans que sa fonction précise ne soit identifiée. Les premières études sur le sujet témoignent d'un rôle dans le contrôle de la croissance des tissus. Nous disposons d'un modèle unique d'exploration de la fonction de REDD1 grâce à des souris déficientes pour REDD1 (REDD1<sup>-/-</sup> nomenclature internationale : Ddit4tm1Fein). Nos résultats préliminaires ainsi que des travaux déjà publiés montrent que l'expression de REDD1 est augmentée par l'exercice musculaire et que REDD1 jouerait un rôle dans le métabolisme énergétique. De plus, les souris déficientes pour REDD1 présentent une altération des performances physiques.

Ce projet de recherche fondamentale propose de cerner les mécanismes d'action de REDD1 dans le muscle squelettique. Les résultats pourraient ouvrir sur des stratégies pour le maintien de la masse et/ou des performances du muscle chez des personnes atteintes de pathologies associées à une faiblesse musculaire. De manière plus large, la connaissance générée par ces travaux pourrait resurgir sur les autres domaines d'étude de REDD1 : pathologies neuro-dégénérative, cancer et virologie.

Pour ce projet, 120 animaux seront nécessaires: 70 souris C57BL6/J sauvages comme contrôles ainsi que 50 souris knock-out (KO) REDD1<sup>-/-</sup> pour lesquelles la protéine REDD1 est inactivée.

Les animaux seront répartis dans 4 procédures expérimentales:

- 1/ Surexpression de REDD1 dans le muscle de souris sauvages,
- 2/ Administration unique par voie orale d'un anti-inflammatoire (glucocorticoïde), souris sauvages et KO REDD1
- 3/ Course sur tapis roulant, souris sauvages et KO REDD1
- 4/ mise à jeun de 16 heures, souris sauvages et KO REDD1

Les animaux seront hébergés collectivement en cages de taille réglementaire avec pour enrichissement des carrés de ouate. Lors de la mise à jeun, les animaux sont placés en cages individuelles sur grille de mise à jeun et conserveront leur nid. Nous effectuerons une visite de surveillance par jour, y compris les week-ends pour vérifier l'état de santé des animaux ainsi que les conditions environnementales.

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

- « Remplacer » les modèles animaux :

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation. Un même groupe de 20 animaux (10 souris sauvages et 10 souris REDD1<sup>-/-</sup>) servira de contrôle aux procédures 3 et 4.

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

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. Les suivis quotidiens des animaux permettent d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Dans les procédures 2, 3 et 4 les animaux seront euthanasiés rapidement après expérimentation (5 heures après gavage oral, immédiatement après la course ou le jeûne). Dans la procédure 1 les animaux seront pesés deux fois par semaine et euthanasiés 3 semaines après l'injection intra-musculaire. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ( $\geq 15\%$  du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

6435. Ce projet permet de vérifier l'efficacité de candidats médicaments en utilisant des modèles de pharmacologie chez le rongeur, sur les acouphènes et la perte d'audition.

La perte d'audition et les acouphènes sont deux indications pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'existe à ce jour. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les déficiences auditives toucheraient aujourd'hui 15% de la population mondiale. L'impact sociétal est majeur, pouvant entraîner chez les malades, isolement social et dépression. La recherche de thérapies pour le traitement des désordres auditifs est très active, mais les expertises en matière de développement de médicaments incluant les modèles animaux et la mise en œuvre d'une recherche dite « translationnelle » font sévèrement défaut. C'est le contexte dans lequel s'inscrit ce projet qui consiste à générer chez le rongeur, au travers des mêmes causes que celles observées chez l'homme, des acouphènes et/ou une perte d'audition pour vérifier l'efficacité de principes actifs et permettre leur passage en phase clinique.

Le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet est dépendant du nombre de candidats médicaments à tester par an.

On l'estime à un maximum sur 5 ans de 5730 rats et 1000 souris.

Le projet s'établit selon la règle des 3 R :

Remplacer : L'analyse de l'état de l'art de la recherche préclinique dans l'audition montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'homme. Une veille technologique continue permet de rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale.

Réduire : Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et des conseils de scientifiques, experts internationalement reconnus dans le domaine de l'audition. Le nombre de procédures expérimentales est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur les acouphènes ou la perte d'audition. Toute expérimentation fait l'objet d'un calcul de N permettant de définir un nombre minimum d'animaux pour mesurer de manière statistiquement représentative une efficacité.

Raffiner : Les animaux sont pris en charge par des personnes ayant toutes les qualifications pour exercer dans le domaine de l'expérimentation animale. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu. Toutes les mesures fonctionnelles, sont réalisées sous anesthésie pour réduire au maximum l'inconfort, la douleur et l'anxiété des animaux. La priorité est donnée aux procédures non invasives. Dans tous les cas, des points limites ont été définis pour aider à la décision face à une situation « critique ».

6436. 30% des Français auraient un taux de cholestérol total trop élevé, ce qui en fait l'une des anomalies les plus fréquentes dans la population générale. L'augmentation du taux de cholestérol est fortement associée au développement de l'athérosclérose et aux maladies cardio-vasculaires (MCV) en général. Ainsi, la régulation du taux de cholestérol circulant dans le sang est une priorité pour la prévention de ces MCV.

Dans ce contexte, la conversion du cholestérol en coprostanol, molécule non absorbée par l'intestin, par des bactéries intestinales pourrait contribuer à l'élimination du cholestérol de l'organisme, et ainsi limiter la cholestérolémie et le développement de l'athérosclérose.

Seule une fraction de la population humaine héberge des bactéries porteuses de cette activité qui semble bénéfique. Les bactéries responsables de ce métabolisme ne sont pas identifiées et les gènes ainsi que les enzymes impliqués sont encore totalement inconnus. Dans un premier temps, nous avons isolé des bactéries intestinales ayant la capacité de transformer le cholestérol en coprostanol à partir de selles humaines de donneurs ayant une cholestérolémie faible. Ainsi nous avons sélectionné 10 souches bactériennes à fort potentiel.

L'étude portant sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries des interactions complexes sont mises en jeu. De part ce fait, seule l'utilisation d'un organisme vivant, comme la souris, pouvant interagir avec une population bactérienne est adaptée à cette étude. En complément, la souche de souris C57Bl6/J est la plus pertinente et la plus utilisée dans les études sur la cholestérolémie. De plus, utiliser le modèle de souris ApoE KO permet de mettre en place une hypercholestérolémie avec un régime alimentaire riche en cholestérol. C'est pour cela que les souris utilisées au cours de l'expérimentation seront des C57Bl6/J ApoE KO.

Notre objectif sera, tout d'abord, de vérifier si ces 10 souches bactériennes sont capables de s'implanter dans un tractus digestif ainsi que leurs effets sur une cholestérolémie élevée. Pour cela nous testerons chaque bactérie sur 8 souris axéniques (dépourvues de microbiote) en comparaison avec un contrôle négatif ne recevant pas de bactérie mais uniquement le véhicule seul. Dans un deuxième temps, nous testerons de façon plus approfondie trois souches sélectionnées parmi celles qui s'implantent. Deux groupes contrôles (positif et négatif) sont nécessaires : Groupe 1 = administration du véhicule seul, et Groupe 2 = administration des phytostérols. Les phytostérols sont des lipides végétaux ayant la capacité de faire baisser le cholestérol dans le sang. Ils servent alors de contrôle positif car leur administration pour le groupe concerné doit entraîner une diminution de la cholestérolémie (effet déjà démontré chez l'homme et chez la souris). Et trois groupes tests seront mis en place pour étudier les trois souches sélectionnées de manière indépendante (Groupe 3 : administration de la souche 1 ; Groupe 4: administration de la souche 2 et Groupe 5 : administration de la souche 3). Quatre autres groupes permettront d'étudier l'association de souches afin de mettre en évidence un effet synergique sur la cholestérolémie et l'athérosclérose (Groupe 6 : administration des souches 1 + 2 ; Groupe 7: administration des souches 1 + 3 ; Groupe 8 : administration des souches 2 + 3 et Groupe 9 : administration des souches 1 + 2 + 3). Pour cette partie, l'ensemble des groupes recevra un régime riche en cholestérol. Ainsi nous pourrions nous assurer que ces souches possèdent bien *in vivo* la capacité à convertir le cholestérol en coprostanol et à réduire la cholestérolémie.

Nous utiliserons pour notre étude au maximum 160 souris C57Bl6/J. Pour les deux tests (test d'implantation des souches bactériennes et test de la capacité à réduire la cholestérolémie) nous utiliserons 8 souris par groupe, nombre nécessaire et suffisant afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Soit 88 souris pour le test d'implantation des souches et 72 souris pour le test de la capacité à réduire la cholestérolémie.

Une fois par semaine durant l'expérience, les souris seront pesées et nous ferons sur toutes les souris des prélèvements de fèces de façon naturelle (le simple fait de prendre la souris la fait déféquer naturellement), ainsi qu'un prélèvement de sang au niveau de la joue du début jusqu'à la fin d'étude (procédure 1 : pendant 43 jours; procédure 2 : pendant 56 jours) afin de mesurer la cholestérolémie. Les gestes techniques tels que le gavage (implantation des bactéries) ou le prélèvement de sang pouvant entraîner des souffrances (irritation de l'œsophage, hémorragie lors de la prise de sang) ils seront réalisés par un personnel compétent et expérimenté, afin de diminuer au maximum le risque de douleur lié à ces gestes. De plus, après chacun de ces gestes chaque animal sera observé attentivement dans les minutes qui suivent afin de réagir au plus vite en cas de souffrance de l'animal.

Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement du milieu par l'ajout de sopalin (pour faire un nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les animaux seront toujours par 4 pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

6437. Les anticorps polyclonaux de mouton anti-immunoglobuline de lapin sont utilisés depuis plus de vingt ans dans la production de réactif de diagnostic *in vitro* pour la production de plusieurs tests de diagnostic :

- des maladies métaboliques liées aux hormones stéroïdiennes (estradiol, testostérone, cortisol) ;
- du suivi du traitement par la digoxine de l'insuffisance cardiaque.



Les anticorps de mouton sont utilisés pour assurer la sensibilité des tests en assurant la capture des anticorps spécifiques de lapin dirigés contre chacune des molécules à doser (estradiol, testostérone, cortisol, digoxine).

L'anticorps polyclonal de mouton anti-immunoglobuline de souris est utilisé dans la production de réactif de diagnostic *in vitro* pour la mesure de la concentration de l'hormone thyroïdienne T4. Le dosage de cette hormone est réalisé dans le cadre d'un bilan de la fonction thyroïdienne dans l'espèce humaine. Ces anticorps de mouton ont pour fonction d'assurer la spécificité du test qui est une des performances critiques de ce test de diagnostic.

Les immunisations à réaliser dans le cadre de ce projet porteront, en fonction des besoins en tests à fournir sur une période de 5 ans, sur 50 moutons.

En l'absence de modèle *in vitro* performant, c'est l'espèce ovine qui a été choisie. Des résultats antérieurs ont montré l'efficacité de l'immunisation chez cette espèce. La qualité des anticorps ainsi obtenus s'est révélée satisfaisante (affinité et spécificité) et répond bien aux besoins en diagnostic. Cette espèce donne la possibilité d'effectuer des prélèvements consécutifs de sang à différentes reprises, ce qui permet de produire des quantités importantes de sérum hyper-immun et ainsi de limiter le nombre d'animaux impliqués dans le projet pour couvrir les besoins pour les 5 prochaines années de production. L'utilisation de méthode de production alternative (*in vitro*), qui correspondrait à une modification majeure du design, n'est pas viable du point de vue industriel et n'est donc pas pratiquement réalisable.

Il est probable que seules 2 ou 3 séries de 4 à 5 nouveaux moutons soient démarrées sur la période de 5 ans compte-tenu du fait que la durée de vie productive des animaux est de l'ordre de 5 à 8 ans et que les volumes de sérum hyper-immuns récoltés sont importants, assurant ainsi une dizaine d'année de fabrication de kits.

Les moutons, animaux grégaires, sont stabulés en petits groupes dans des conditions conformes à la réglementation et adaptées à l'espèce.

Par expérience, ces protocoles ne sont pas susceptibles d'occasionner douleur, souffrance ou angoisse. Toutefois, la surveillance particulière et quotidienne de ces animaux en protocole assure, en cas de signes cliniques, le déclenchement de soins spécifiques sur les conseils d'un vétérinaire.

6438. Les tumeurs cérébrales étant de mauvais pronostic, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est indispensable. Actuellement, trois types de traitements sont utilisés dans la prise en charge des patients: la chirurgie, la radiothérapie et des traitements médicaux (chimiothérapie et thérapies ciblées). Pour ces tumeurs un protocole basé sur une chirurgie suivie d'une chimio-radiothérapie représente le traitement de choix. Malgré ces traitements très agressifs la forme la plus avancée de ces tumeurs demeure incurable avec un taux de survie de 30 % à 1 an et de moins de 5% à 5 ans. Aussi, la recherche s'oriente vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'évaluation de l'effet de nouvelles thérapeutiques nécessite le développement de procédures *in vitro* (en laboratoire). Néanmoins, les cellules tumorales se comportent différemment *in vitro* et *in vivo* (dans un organisme vivant) en termes de croissance, de dissémination, de résistance aux traitements, etc. Aussi, l'évaluation du bénéfice de nouvelles thérapeutiques requière le développement de modèles précliniques (modèles animaux) intégrant l'ensemble de la biologie d'un organisme vivant.

Dans ce contexte nous avons fait un premier projet (validé précédemment par le comité d'éthique) qui vise à mettre en place différents modèles tumoraux pertinents chez la souris et notamment de tumeurs cérébrales.

Ce projet fait donc suite à ces travaux et vise à évaluer l'efficacité de nouveaux traitements thérapeutiques (protocole de radiothérapie innovant, chimiothérapie, etc.) dans les modèles de tumeurs cérébrales préalablement établis et caractérisés, implantés en sous cutanée ou directement dans le cerveau.

Ces modèles porteront sur l'implantation de cellules tumorales dans des souris et sur l'évaluation d'un nouveau traitement innovant. Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par mesures physiques directes (modèles sc) et par des méthodes non invasives (e.g. Bioluminescence, IRM).

Ce projet nécessitera l'utilisation de 500 animaux.

Au regard de la règle des 3R

Remplacer : L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques qui auront été préalablement validées *in vitro*.

Réduire : De nombreux laboratoires internationaux ont déjà développé des modèles tumoraux. Aussi, nous nous baserons sur leurs différents travaux afin de bénéficier de leur expérience. Par ailleurs, notre plus-value porte sur l'utilisation de cellules tumorales dites « primaires » (très proche de la maladie humaine) et également de modèle orthotopiques (modèle intracérébral) peu répandus. Enfin, les lots utilisés seront de 7 souris, ce qui est suffisant pour avoir une bonne idée de d'un effet thérapeutique intéressant (tests statistiques) et qui est très souvent utilisé dans diverses publications scientifiques.

Raffiner : Pour limiter toute souffrance animale inutile, les cellules tumorales utilisées (testées *in vitro*) seront dans un premier temps implantées en sous cutanée afin de vérifier d'un premier effet thérapeutique du traitement testé. Cela préservera des injections dans le cerveau, bien évidemment invasives.

Les techniques de suivi non-invasif (Bioluminescence, IRM) et le suivi longitudinal qui en découle permettront également de faire un suivi cinétique non douloureux, de réduire le nombre d'animaux utilisés, et est tout à fait pertinent quant à la mise en place et à la caractérisation des modèles tumoraux.

6439. Le réseau des capillaires de la rétine est modifié dans de nombreuses pathologies oculaires dont la rétinopathie diabétique et le glaucome, maladies de plus en plus fréquentes actuellement pour lesquelles le risque de cécité est très important.

Ce projet vise à étudier le système vasculaire de l'œil d'un rongeur transgénique dont une molécule de cohésion des cellules endothéliales est modifiée sur un acide aminé. La compréhension des mécanismes moléculaires qui se déroulent au niveau des cellules endothéliales de l'œil permettrait l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour ces pathologies oculaires.

Notre étude est réalisée sur les capillaires de rétines d'un modèle rongeur car il est impossible de reproduire *in vitro* l'architecture du réseau vasculaire rétinien d'un organisme vivant. Pour cela, les animaux seront anesthésiés et euthanasiés immédiatement après l'injection d'un produit se localisant dans le système vasculaire (comme l'angiographie chez l'humain) permettant de visualiser le réseau vasculaire de l'œil.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés. Leur nombre (90) est calculé suivant des tests statistiques appropriés de façon à les réduire au minimum nécessaire.

Ils sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements de milieu leur permettant de varier leurs activités tout au long de la journée. Le personnel en charge des animaux, assurent quotidiennement leur suivi clinique. Lors d'observation de signes particuliers chez un animal, les expérimentateurs seront avertis pour permettre d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

6440. L'hépatite est une maladie du foie, qui lorsqu'elle devient chronique favorise le développement de la cirrhose et du cancer du foie. Il est donc important de travailler pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette maladie pour envisager de nouveaux traitements. L'équipe travaille sur ce problème et en particulier sur la régulation et le rôle de cytokines qui sont des molécules de dialogue importantes entre les cellules et le système de défense de l'organisme. Nous avons obtenu des résultats sur plusieurs cytokines à partir de l'étude d'échantillons humains dans un premier temps et au moyen de plusieurs modèles expérimentaux d'hépatite murine dans un 2ème temps. Ces résultats indiquent

- un rôle protecteur de la cytokine nommée IL-33 dans le développement et le contrôle de l'hépatite

- un rôle de la molécule intracellulaire nommée RIPK1 dans la sensibilité des hépatocytes à la mort dans différents types d'hépatite impliquant le facteur de mort cellulaire dénommé TNF.

Pour améliorer notre connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la mort des hépatocytes qui donne l'hépatite et comprendre comment différentes cytokines peuvent être protectrices, il faut mener des études *in vitro* au moyen de cultures primaires d'hépatocytes murins. Ces cellules nous permettront d'étudier (i) les facteurs d'induction de la mort cellulaire des hépatocytes, (ii) les mécanismes moléculaires survenant lors de la mort de ces cellules, (iii) les voies moléculaires contrôlant la balance survie/mort des hépatocytes (iv) des molécules chimiques pouvant présenter un intérêt thérapeutique par une action protectrice de la mort des hépatocytes. L'intérêt d'exploiter des cultures primaires d'hépatocytes murins est notoire car nous disposons des animaux déficients pour différents gènes d'intérêt pour notre recherche, tels que la cytokine nommée IL-33, son récepteur ou des gènes clés impliqués dans la balance mort cellulaire/survie. Ceci renforce la nécessité de développer nos études sur le modèle souris plutôt que d'autres espèces ou même humain.

Dans ce but nous envisageons d'avoir recours à 200 animaux. L'ensemble de la procédure sera réalisé dans l'esprit des 3R. Tout d'abord, il s'agit ici d'une procédure d'étude du foie remplaçant le traitement des animaux par l'étude en culture du comportement des hépatocytes, sachant que les lignées stables de cellules hépatocytaires existantes sont des cellules immortelles et donc inutilisables pour l'objet de notre étude ce qui affecte la mort/survie des hépatocytes. L'obtention d'un grand nombre d'hépatocytes à partir d'un animal permet un grand nombre de test et réduit le nombre d'animaux qui seraient requis pour de tels expérimentation *in vivo*, et le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à la mise en place des expériences absolument requises en prenant soin de programmer/regrouper les tests de façon à utiliser la totalité des cellules produites. En termes de raffinement, la procédure a été travaillée pour limiter le stress des animaux (traitement dans une salle dédiée et contention par un chercheur expérimenté), et pour empêcher la douleur par l'administration de sédatif et d'antidouleur et qu'il n'y aura pas de réveil.

6441. La mucoviscidose est la maladie génétique létale la plus fréquente en Europe. Les différentes mutations génétiques pouvant entraîner cette maladie touchent la protéine CFTR (la plus fréquente étant une délétion en position 508 du gène codant pour la protéine CFTR), responsable notamment de l'équilibre hydro-électrique des cellules. L'absence ou la non-fonctionnalité de cette protéine entraîne une augmentation de la viscosité du mucus pulmonaire et donc une dysfonction respiratoire qui expose les malades aux infections pulmonaires, en particulier au virus de la grippe.

La grippe est une maladie aiguë des voies respiratoires, due à une infection par le virus influenza. Étant l'un des pathogènes les plus importants des voies respiratoires, elle touche particulièrement les patients atteints de mucoviscidose qui ont un tractus respiratoire fragilisé. La grippe accroît la sévérité de la maladie.

L'objectif de cette étude est d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'inflammation durant les infections grippales dans un contexte de mucoviscidose et notamment d'étudier le rôle des plaquettes pro-inflammatoires et cytotoxiques dans la pathogénicité du virus de la grippe dans le cadre de la mucoviscidose. Ceci nous permettra d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques et de tester des molécules ciblant la fonction plaquettaire déjà présentes sur le marché.

Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux et la souris apparaît comme l'espèce la plus adaptée aux types de recherches envisagées étant donné l'existence d'un modèle de mucoviscidose, en tenant compte de l'expérience des membres du projet utilisant cette espèce pour les infections virales ainsi que les données de la littérature scientifique.

Un total de 480 souris sera utilisé pour mener à bien ce projet. Elles seront hébergées par groupe de 5 maximum avec une surface au sol minimale de 77 cm<sup>2</sup>/souris (cages de 589 cm<sup>2</sup>).

Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats satisfaisants, statistiquement significatifs. Afin de limiter la douleur, les souris seront surveillées et

pesées chaque jour, y compris les weekends et les jours fériés, et au premier signe de douleurs les souris seront euthanasiées immédiatement.

Par ailleurs, afin de limiter et de prévenir toute souffrance et angoisse des animaux, nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimatation de 7 jours après leur arrivée en zone d'hébergement. Afin d'élever le bien-être de l'animal, les cages seront enrichies notamment avec du coton, aucun hébergement individuel n'est prévu et les expériences seront menées par le même expérimentateur du début à la fin.

L'ensemble des expériences aura lieu dans une animalerie A2 et un laboratoire P2.

6442. La carence en vitamine D est un problème de santé publique majeur: 78.7% des hommes sont carencés en France et 81.4% des femmes (pour une valeur plasmatique de vitamine D inférieure à 30ng/ml). Dans cette population féminine déficiente en vitamine D, on retrouve des femmes en âge de procréer, qui elles exposent donc leur embryon à des taux anormalement bas en vitamine D. Par ailleurs, la littérature a déjà mis en évidence l'importance de la nutrition maternelle gestationnelle dans la programmation métabolique de l'adulte.

Le premier objectif de ce projet est donc de mettre en évidence l'impact métabolique d'une carence gestationnelle en vitamine D sur des souris mâles et femelles.

Cet impact d'une carence en vitamine D durant la période néonatale sera étudié en condition d'alimentation standard mais également en condition pro-obésogène (induite par un régime riche en graisse) afin d'évaluer l'impact combiné d'une carence en vitamine D et d'une obésité sur le devenir métabolique des souris.

Pour ce faire, des souris mâles et femelles C57Bl6j ayant subi une carence gestationnelle en vitamine D (préalable) seront rendues obèses par la consommation d'un régime riche en lipides (HF 45, 45% de l'énergie apportée) pendant 8 semaines. Un groupe recevant un régime à teneur normale en lipides (régime d'entretien AIN-93M) pendant toute la durée de l'étude (8 semaines) servira de groupe contrôle normopondéral. Le nombre total d'animaux nécessaire sera de 80.

Afin de mettre en évidence le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques, une combinaison de mesures sont prévues:

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique;
- passages en cage calorimétriques pendant 24 heures afin de mesurer différents paramètres permettant d'affiner la caractérisation du phénotype obèse (consommation d'oxygène et expiration de dioxyde de carbone, prise alimentaire et hydrique)
- collection des fèces en début puis au cours du protocole pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications du régime.
- mesure de la réponse à une injection intrapéritonéale d'insuline (semaine 8) afin de mettre en évidence des anomalies du métabolisme glucidique.

A l'issue des 8 semaines de régime, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale.

Cette étude prend en compte la règle des 3 Rs:

Remplacement: il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution *in vitro* pour étudier l'impact d'un régime alimentaire sur le microbiote et le développement de l'obésité. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement: les méthodes utilisées sont en majorité non invasives et l'utilisation de cages calorimétriques permet de recueillir un grand nombre de données (enregistrement sur 24 heures) en utilisant un faible nombre d'individus (10 souris/ groupe).

L'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal.

6443. Un antibiotique du groupe des macrolides est disponible sur le marché pour traiter les infections respiratoires associées à *Pasteurella*, *Actinobacillus* et *Mycoplasma* d'origine bovine, porcine ou aviaire. Il n'y a pas d'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement des agneaux en engraissement. Cependant, lorsqu'aucun médicament autorisé et approprié n'est disponible, l'utilisation d'un médicament vétérinaire hors AMM est autorisée pour des animaux d'une autre espèce dans la même indication thérapeutique. L'usage de cet antibiotique en atelier d'engraissement ovin est alors particulièrement intéressant lors de l'apparition de résistances aux autres antibiotiques classiquement utilisés, lors de défauts d'approvisionnement en un autre antibiotique possédant une autorisation AMM (par exemple, ruptures fréquentes d'approvisionnement en sulfadiméthoxine), et dans le cadre de la réduction de l'usage d'antibiotiques "critiques" pour les conserver uniquement dans le cadre du traitement de certaines maladies infectieuses chez l'Homme.

La seule difficulté concernant l'utilisation de cet antibiotique est son temps d'attente très long. Le temps d'attente est l'intervalle entre la dernière administration d'un médicament en condition d'usage normal et le temps auquel les animaux traités peuvent être euthanasiés pour la production de denrées alimentaires sûres. Il est de 14 jours chez les porcs contre 42 jours chez les veaux. Comme le temps d'attente n'est pas connu chez l'agneau, lors de son utilisation en atelier d'engraissement ovin, le temps d'attente appliqué est le plus long soit 42 jours. Or, la durée d'engraissement des agneaux est de 60 à 90 jours. L'utilisation de l'antibiotique est donc limitée, dans ces conditions, au premier mois voir aux premiers 15 jours après entrée des agneaux dans le bâtiment.

L'objectif de ce projet est de déterminer si ce temps d'attente peut être réduit chez les agneaux en engraissement.

Afin de répondre à cette question, 22 agneaux recevront l'antibiotique par voie orale deux fois par jour pendant 5 jours. Les concentrations plasmatiques en antibiotique seront déterminées dès le premier jour d'administration et tout au long de

l'expérimentation. Les concentrations tissulaires (muscle, tissu adipeux, foie et reins soit les tissus représentatifs d'un point de vue réglementaire des denrées alimentaires chez l'agneau) seront déterminées à 6 temps d'abattage soit 4, 21, 28, 35, 41 et 49 jours après la dernière administration de l'antibiotique par voie orale. Deux agneaux seulement seront euthanasiés 4 jours après la dernière administration de l'antibiotique afin d'estimer le rapport des concentrations en antibiotique dans les tissus et le plasma pour un temps où les concentrations plasmatiques seront encore quantifiables. Pour les 5 autres temps, 4 agneaux seront euthanasiés. Ce nombre correspond au nombre minimum recommandé par l'EMA/CVMP (European Medicines Agency/Committee for Medicinal Products for Veterinary use) pour la détermination des temps d'attente. Tous les animaux seront euthanasiés pour prélèvement des tissus après surdosage d'anesthésique. Afin d'éviter toute administration périverneuse qui pourrait être douloureuse, un cathéter sera placé dans une des veines jugulaires avant injection.

6444. Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé (définition de l'organisation mondiale de la santé). En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, dont les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Face à ce problème majeur de santé publique, plusieurs approches sont utilisées, dont l'utilisation de compléments alimentaires permettant de limiter la prise de poids et/ou les désordres métaboliques associés à l'obésité (par exemple l'insulino-résistance).

Dans ce projet nous chercherons à mettre en évidence l'effet d'un extrait végétal de composition confidentielle sur l'obésité et l'insulino-résistance, dans le but ultime de développer un complément alimentaire chez l'homme.

Nous étudierons l'effet biologique de l'extrait en utilisant un modèle génétique d'obésité (souris ob/ob) dans le cadre d'un régime à teneur lipidique normale supplémenté ou non avec l'extrait.

Le nombre total d'animaux nécessaires sera de 40.

Le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques sera caractérisé de la façon suivante :

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire ;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique ;
- collection de fèces en début puis au cours du protocole pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime ;
- mesure de la réponse glycémique en réponse à l'insuline pour mettre en évidence un dysfonctionnement de la réponse à l'insuline.

A l'issue des études, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale pour prélèvement d'organes dans l'optique de caractériser les effets biologiques dans différents tissus.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier l'impact de compléments alimentaires sur l'insulino-résistance et la prévention de l'obésité. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes. Nous combinerons des études réalisées des études appliquées concernant la mise au point de compléments alimentaires en collaboration avec une société industrielle avec une étude de recherche fondamentale (effet de la vitamine D). Ceci permettra de réduire le nombre d'animaux en utilisant les mêmes groupes contrôle pour l'étude de l'effet de la vitamine D et celui de l'extrait à l'aide du modèle ob/ob.

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives. Les animaux seront hébergés en cage de 2 à 3 individus, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de kraft).

6445. Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'homme. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacocinétique, de la toxicologie ou encore de l'efficacité. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament et sont donc indispensables.

Le cancer affecte des millions de personnes chaque année. Cette pathologie a donc des impacts sociaux et économiques majeurs sur les patients et le système de santé. Les thérapies actuellement disponibles pour traiter le cancer ont une efficacité limitée pour certaines indications comme par exemple le cancer du pancréas ou le cancer du poumon et les effets secondaires des traitements limitent considérablement leur utilisation. Il y a donc un besoin urgent de trouver de nouvelles molécules efficaces ayant un effet anti-cancéreux démontré. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet. Les retombées attendues incluent le screening *in vivo* de nouvelles molécules efficaces, l'étude si besoin de leur mécanisme d'action et l'évaluation des meilleurs candidats avant une éventuelle utilisation en clinique chez l'homme. Ainsi, ces études permettront de trouver potentiellement de nouveaux médicaments dont les effets seraient supérieurs aux molécules de référence déjà existantes.

Pour cela, la technique greffe de cellules cancéreuses en sous-cutanée chez la souris va être employée. C'est un outil puissant qui permet le suivi aisé de la croissance tumorale *in vivo* mais qui permet d'étudier d'autres paramètres complémentaires comme par exemple le flux sanguin intra-tumoral *in vivo* (angiogenèse) ou encore l'analyse morphologique et histologique des tumeurs après exposition aux traitements testés voire une analyse transcriptomique et/ou protéomique sur les échantillons de tumeurs après nécropsie. La technique consiste à injecter une suspension de cellules cancéreuses sous la peau de la souris, généralement au niveau du flanc. Une fois que la tumeur est bien établie et a atteint une taille minimum de 100 mm<sup>3</sup>, le traitement de la nouvelle molécule

à tester peut commencer afin d'évaluer ses capacités anti-tumorales et/ou anti-angiogéniques potentielles. L'utilisation de la souris comme modèle d'étude permet de tester le traitement dans un contexte physiologique. Notamment, en fonction de l'origine murine ou humaine des cellules cancéreuses greffées, ce projet sera réalisé sur des souris immunocompétentes ou immunodéficientes (pour s'affranchir de l'impact du système immunitaire de la souris sur le développement de la xénogreffe de cellules humaines), respectivement.

L'injection de lignées cancéreuses sous la peau de la souris induira la formation d'une tumeur différente en fonction de l'origine des cellules : tumeur ovarienne, pancréatique, de colon, de mélanome etc. Les composés dont l'efficacité potentielle sera testée dans ce modèle auront fait l'objet auparavant d'études *in vitro* afin de limiter l'expérimentation animale au maximum et de se concentrer uniquement sur les molécules avec une réelle potentialité et/ou relevant pour les études mécanistiques. Au moins 2 types cellulaires différents par molécule étudiée seront testés par étude.

Il est ainsi estimé que 4800 animaux seront nécessaires pour réaliser 40 études pendant une durée de 5 ans. Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 8 nouvelles molécules thérapeutiques potentielles par an.

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

- « Remplacer » les modèles animaux :

Ce projet se focalise sur un modèle intégré d'étude du développement tumoral et/ou de l'angiogenèse (mesure du flux sanguin intra-tumoral) nécessitant l'utilisation d'un modèle animal. Ce système est indispensable pour reproduire la physiologie d'un organisme entier permettant la formation de la tumeur. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant ces procédures expérimentales. Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux pour pouvoir tester l'effet du traitement sur la croissance tumorale dans un contexte physiologique.

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

Pour les expérimentations, il a été prévu un nombre suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur l'efficacité du traitement. Ce protocole ne sera mis en place qu'avec des lignées cancéreuses qui auront répondu au traitement lors d'études *in vitro* préliminaires afin de limiter l'utilisation des animaux.

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

La procédure d'implantation en sous-cutanée des cellules cancéreuses se fera sous anesthésie générale afin de bien maîtriser le geste et que la tumeur soit placée à un endroit qui ne gêne pas l'animal. Les souris seront suivies quotidiennement (5j/semaine) pour pouvoir identifier les signes de souffrance caractérisés par le comportement de la souris (mobilité, alimentation, agressivité, cris...), le poids du corps (qui sera mesuré 2 fois par semaine) limité à une perte de 20% maximum par rapport au poids initial, l'état du pelage le cas échéant, la consistance des fèces. Si les signes persistent au bout de 24h, l'animal sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié. Le volume de la tumeur sera mesuré 2 fois par semaine : si le poids tumoral dépasse 10% du poids de la souris, celle-ci sera euthanasiée pour raison éthique.

6446. Seconde production piscicole mondiale (4,8 millions de tonnes) après les carpes, le tilapia du Nil est produit dans plus de 100 pays, consommé dans le monde entier et plus particulièrement dans les pays du Sud où il est parfois qualifié de poulet aquatique. Pour éviter les conséquences négatives d'une trop grande efficacité de reproduction et bénéficier de la meilleure croissance des mâles, des populations exclusivement composées de mâles (populations monosexes mâles) sont majoritairement produites en élevage, par un traitement hormonal à la 17 alpha-méthyltestostérone (17MT). A l'échelle mondiale, plus d'une tonne de 17MT est ainsi utilisée chaque année pour le contrôle du sexe chez le tilapia. S'il est souvent considéré que les alevins de tilapia éliminent rapidement la 17MT ingérée, ces traitements soulèvent toutefois des questions de 1) sécurité sanitaire (pour les employés des piscicultures en contacts réguliers avec l'eau et les sédiments contaminés où la bio-activité des résidus peut durer plusieurs mois ; pour les consommateurs), 2) d'impact des résidus de traitement sur la qualité des eaux naturelles en aval des piscicultures de tilapia (rejets dans les rivières) mais aussi sur la biodiversité des espèces aquatiques, et donc de durabilité de telles approches pour l'aquaculture. C'est pourquoi, après l'Europe, un nombre croissant de pays n'autorise plus l'utilisation de tels traitements pour une production directe de poissons destinés à la consommation humaine. Nos études chez le tilapia du Nil ont mis en évidence un déterminisme du sexe complexe dans lequel interviennent des chromosomes sexuels (XX/XY), des facteurs génétiques parentaux et la température. Sur la base de ces études, deux approches ont été identifiées comme de possibles alternatives à l'utilisation des hormones: la production de géniteurs YY à descendance 100% mâles (approche génétique), ou l'utilisation de traitements masculinisant par de fortes températures (approche environnementale). Pour chacune de ces 2 approches, et pour chaque souche considérée, il est d'abord nécessaire de caractériser le poids respectif des facteurs génétiques (majeurs et mineurs) et environnementaux (effets masculinisant des fortes températures = thermosensibilité) déterminant le sexe puis de mettre en place un programme de sélection génétique pour renforcer le poids de l'un de ces 2 facteurs. C'est ce que notre groupe a réalisé ces dernières années.

La question suivante que nous souhaitons traiter est celle de la probable évolution de la balance entre ces facteurs génétiques et la thermosensibilité dans le déterminisme du sexe chez le tilapia du Nil, dans un contexte de changement climatique: en d'autres termes, la thermosensibilité d'une famille ou d'une population est-elle amenée à disparaître progressivement au fil des générations dans un contexte de réchauffement climatique ? En effet, on peut penser qu'au-delà d'une certaine température du milieu, la persistance d'une thermosensibilité peut alors devenir un risque pour une population. De la réponse à cette question dépendra le choix et la gestion des individus/souches/populations qui seront élevés demain et celui de la meilleure alternative à l'utilisation des hormones pour un contrôle du sexe respectant le consommateur et son environnement pour une aquaculture durable du tilapia.

Pour cela, nous comparerons l'évolution de la thermosensibilité et de ses mécanismes (analyse de sex-ratio, recherche de marqueurs de thermosensibilité par des approches de transcriptomique sur la gonade et le cerveau, recherche de marques épigénétiques) sur des

descendances issues de géniteurs ayant eux-mêmes été exposés à différents régimes thermiques durant leur période sensible (10 à 40 jours post-fécondation (jpf)) ; nous analyserons également le potentiel de reproduction (comportement, fitness, physiologie du sperme) de néomâles XX issus d'un traitement thermique masculinisant versus des mâles génétiques XY. Dans cette dernière optique, nous étudierons, pendant la période thermosensible, l'effet de la température sur la croissance et la survie des jeunes poissons, afin de déterminer l'optimum thermique de croissance et ses variations ontogénétiques. Ces valeurs seront comparées à celles affectant le sexe phénotypique des poissons, et à leurs préférences thermiques, avec pour objectif de comprendre si les poissons choisissent des températures masculinisantes, et les conséquences de ces choix en termes de fitness. Toujours dans le registre de la fitness, ces études seront prolongées par des analyses des potentialités reproductrices des mâles et néomâles, par l'étude de la motilité des spermatozoïdes. Ces différentes approches permettront d'estimer les risques d'évolution des sex-ratios dans les populations naturelles, et par suite leur résilience. Des géniteurs de quatre souches : Manzala-Egypte ; Chitralada-Japon ; Loboï-Kenya et Turkana-Kenya seront utilisés car leurs traits d'histoire de vie vis-à-vis de la température sont contrastés, certaines souches étant connues pour leur thermosensibilité, d'autres issus d'environnement naturellement très chauds (sources chaudes).

Les phénomènes physiologiques complexes (croissance, génomique, transcriptomique) étudiés ne peuvent l'être que sur des animaux entiers vivants, il n'existe donc pas encore de méthode de REMPLACEMENT. Les effectifs des lots sont déterminés par le nombre minimum (REDUCTION) de poissons nécessaires pour obtenir une quantité suffisante de matériel (les individus pèsent quelques dizaines de milligrammes) et obtenir des résultats exploitables statistiquement, mais aussi la taille minimum d'une cohorte pour que le comportement grégaire des alevins s'exprime pleinement (comportement de banc) et limite ainsi les comportements agressifs (territorialité) (RAFFINEMENT). Les protocoles utilisés sur les poissons sont des méthodes d'élevage classiques, effectuées dans le cadre des bonnes pratiques aquacoles (RAFFINEMENT). La reproduction et l'élevage en captivité de cette espèce sont bien maîtrisés et les conditions de températures sont celles rencontrées par l'espèce dans son milieu naturel, elles n'entraînent pas de stress particulier.

L'étude sera réalisée dans deux établissements en milieu contrôlé sur des pontes spontanées de géniteurs captifs marqués individuellement (puces électroniques, applicables à des poissons de petite taille sans effet négatif). Les géniteurs sont des poissons nés en captivité et produit sur place, provenant de quatre souches. Un total de 24400 alevins sera utilisé dans cette étude.

6447. En 2000, il a été mis en évidence que des mutations dominantes dans le gène Opa1 sont responsables de l'Atrophie Optique Dominante (AOD), une neuropathie du nerf optique conduisant à la perte progressive de la fonction visuelle.

Depuis 2008, le spectre clinique de l'AOD liée au gène Opa1 s'est grandement étendu. Il englobe des formes ne comprenant qu'une atteinte de la fonction visuelle mais aussi des formes plus sévères associant à la perte de vision, une surdité, une atteinte de la fonction neuromusculaire avec présence de neuropathie périphérique, de myopathie et d'ataxie. Des atteintes du système nerveux centrales ont aussi été répertoriées chez les patients. Le gène Opa1 est à l'origine d'une protéine des mitochondries (organite qui fournit l'énergie dans les cellules de l'organisme), impliquée dans de nombreuses fonctions importantes pour la survie cellulaire notamment dans le maintien de l'activité mitochondriale. Bien que l'AOD soit marquée par la perte des cellules ganglionnaires de la rétine, la physiopathologie de l'AOD reste encore non élucidée et aucune solution thérapeutique n'est actuellement disponible. Deux modèles murins ENU-mutagenés ont été créés. Tous deux développent une atteinte de la fonction visuelle mais aucun ne présente d'atteinte sévère. Nous avons choisi de créer un nouveau modèle de souris Opa1 portant pour la première fois une mutation humaine, la mutation récurrente c.2708\_2711delTTAG. Ce nouveau modèle devrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie de l'AOD et de pouvoir mettre en place des essais thérapeutiques palliant l'effet délétère de la mutation humaine.

Notre projet consiste à étudier les mécanismes physiopathologiques de l'AOD à l'âge adulte. Notre projet prévoit également de tester l'efficacité des solutions thérapeutiques de types pharmacologiques pouvant prévenir l'apparition des symptômes visuels, par administration *per os*, intra-péritonéales ou par voie intra-vitréenne.

Grâce à nos précédentes investigations, nous savons qu'il est important de cibler nos expérimentations sur deux lots d'animaux modèles, le premier sera étudié jusqu'à l'âge de 5 mois et l'autre jusqu'à l'âge de 11 mois. Cette étude sera menée en conformité avec les recommandations de la règle des 3R. Nous veillerons à utiliser un nombre minimum et suffisant d'animaux soit un total de 240 animaux seront étudiés: 120 pour l'étude fonctionnelle, histologique et moléculaire (un lot de 60 animaux étudiés jusqu'à 5 mois et un deuxième lot étudié jusqu'à 11 mois) et 120 animaux pour l'étude de thérapie pharmacologique. Ces animaux sont hébergés dans un environnement conforme et enrichi (copeaux de bois, igloo, boudin de cellulose). Nous anesthésierons les animaux lors des tests fonctionnels et nous évaluerons quotidiennement l'état des animaux en expérimentation. Le personnel qualifié de notre animalerie pourra prodiguer les soins éventuels aux animaux malades et veillera au respect des points limites en cas de gêne ou souffrance manifestées.

6448. Notre projet de recherche consiste à étudier les mécanismes moléculaires impliqués lors de l'entrée des cellules en division cellulaire. Ces processus sont étudiés depuis plusieurs années mais de nombreuses zones d'ombres persistent encore. En particulier, nous ne connaissons pas les mécanismes qui déclenchent la division des cellules (mitoses) ou en d'autres termes qui permettent le passage d'un ADN décondensé à un ADN où les chromosomes s'individualisent pour se répartir ensuite au sein des deux cellules filles issues de la division cellulaire. Cette étape est cruciale pour comprendre comment une cellule se divise normalement et transmet son patrimoine génétique aux cellules filles. Afin de répondre à ces questions, nous devons obtenir des anticorps spécifiques qui détectent nos protéines d'intérêt le plus spécifiquement possible. Ces protéines d'intérêt sont pour la plupart des régulateurs de la mitose ayant été caractérisés, chez nous ou dans d'autres laboratoires, à partir de modèles d'étude comme la levure, la drosophile, les ovocytes de xénope ou de souris. Notre projet consiste à comprendre comment tous ces acteurs moléculaires interagissent dans le temps et dans l'espace lors de l'entrée en mitose et pendant la progression de la division cellulaire. Nous utiliserons deux modèles

d'étude : les cellules humaines en culture et les extraits d'œufs de xénope. Ces deux modèles sont complémentaires. En effet, les extraits d'œufs de xénope nous permettent de réaliser des expériences d'immuno-précipitation et des Western Blot. Ensemble ces expériences permettent de comprendre comment ces acteurs moléculaires agissent chronologiquement en enlevant une à une les protéines des voies de signalisation que nous étudions. En ce qui concerne les cellules en culture, elles seront utilisées pour analyser la localisation de ces régulateurs protéiques tout au long de l'entrée et de la progression mitotique. Pour l'ensemble des expériences à effectuer, nous utiliserons les anticorps du commerce ainsi que les anticorps que nous nous proposons de produire lorsque ceux-ci ne sont pas commercialisés. Il est donc indispensable de pouvoir obtenir de tels outils qui nous permettront de répondre aux questions posées et sans lesquels nous ne pourrions progresser dans notre champ d'investigation.

Pour cela, nous envisageons de préparer des anticorps à partir de lapins dédiés à la production d'anticorps. Nous avons pour cela l'expertise d'animaliers formés et des protocoles expérimentaux éprouvés et qui nous ont déjà donnés des anticorps performants.

En ce qui concerne le nombre et l'espèce des lapins que nous allons utiliser : Nous estimons devoir utiliser 25 lapins de l'espèce new Zealand.

Ces lapins seront accueillis dans une animalerie conforme et disposant des nouvelles cages qui respectent la réglementation en cours. De plus, contrairement aux services proposés par les sociétés privées nous n'utilisons qu'un seul lapin par antigènes ce qui réduit de moitié le nombre de lapin sans affecter le résultat. En effet, compte tenu de la qualité actuelle des antigènes, il n'est plus utile d'immuniser deux lapins par antigènes afin d'augmenter la probabilité de réussite. Enfin, outre les nouvelles cages notre personnel animalier s'assure d'un enrichissement de qualité de milieu avec la présence de balles de tennis, d'une alimentation de qualité, des soins par un personnel qualifié ainsi que l'utilisation d'une radio qui rassure l'animal et évite un stress induit par le bruit du personnel animalier lorsqu'il arrive sur place.

6449. L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la troisième cause de mortalité dans les pays industrialisés. Il se caractérise par une défaillance de la circulation sanguine qui affecte une région plus ou moins importante du cerveau. L'AVC survient suite à la formation d'un thrombus (caillot) qui obstrue un vaisseau sanguin provoquant la mort des cellules nerveuses par privation d'oxygène et d'éléments nutritifs essentiels à leurs fonctions. Aucun traitement n'est actuellement satisfaisant pour rétablir la perfusion du cerveau sans risque hémorragique. Il est donc urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces et sûres pour le traitement de l'AVC. Des essais *in vivo* sur la souris ont montré que l'utilisation d'un anticorps spécifique à action ciblée dans l'organisme pourrait constituer un réactif capable d'inhiber la formation du caillot et son extension dans les premiers stades de l'AVC.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont à l'heure actuelle indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Dans ce projet, l'utilisation du modèle primate est privilégiée et se justifie par les spécificités des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le Primate Non Humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez eux seront transposables à ceux qui pourront être observés chez l'Homme.

Ce projet sera divisé en trois procédures. La procédure 1 permettra d'obtenir des données comparatives préliminaires avec une molécule de référence habituellement utilisée chez l'Homme comme anti-agrégant plaquettaire (comparaison avant/après traitement). La procédure 2 consistera à évaluer parmi quatre doses du nouveau candidat médicament, les deux plus efficaces. Les données de cette deuxième procédure pourront être comparées avec celles de la première procédure pour vérifier l'absence d'effet hémorragique qui est un des intérêts de la nouvelle molécule. La procédure 3 utilisera deux doses sélectionnées à la procédure 2 pour affiner la dose optimale chez l'Homme. Des prélèvements sanguins de faible volume seront effectués afin de suivre l'évolution et l'efficacité du traitement.

Pour ce projet, déposé pour une durée de 5 ans, il est prévu d'utiliser au maximum 40 macaques cynomolgus issus d'un élevage agréé. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux utilisés, soit 40 animaux sur 5 ans, a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats interprétables et transposables à l'Homme.

Dès leur arrivée et entre chaque procédure, les animaux seront examinés par un vétérinaire, pour s'assurer de leur bon état de santé. Ils seront suivis individuellement et quotidiennement afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre chaque administration et chaque procédure. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress pouvant être engendré par les manipulations.

6450. La production de lait d'une vache est conditionnée par la capacité intrinsèque de l'animal à produire (prédisposition génétique) et par les conditions d'élevage dans lesquelles elle produit (environnement). La prédisposition génétique de la vache à atteindre un niveau de production laitière n'est pas seulement déterminée par la fonction de production elle-même, mais aussi par des événements physiologiques non directement liés à la production, mais ayant néanmoins un effet sur celle-ci.

Le statut sanitaire de la vache a un effet sur sa capacité de production. Chez la vache laitière l'infection mammaire (mammite) est l'affection la plus fréquente. Elle peut diminuer fortement production de lait et reproduction et les coûts de traitement sont importants. Les mammites sont donc un problème sanitaire et économique majeur pour les éleveurs, et de bien-être pour l'animal.

La production de lait dépend aussi de la capacité d'une vache à utiliser ses réserves énergétiques issues de l'alimentation (lipides, protéines) pour cette fonction. Cette capacité, appelée mobilisation des réserves corporelles, est donc une qualité économique recherchée. C'est un phénomène important dans les races bovines laitières, surtout dans la race Prim'Holstein.

Il est donc nécessaire d'étudier la prédisposition génétique des vaches à résister aux mammites et/ou à mobiliser leurs réserves pour la production, en comprenant la variabilité génétique qui existe entre individus qui sont élevés dans un même environnement.

L'objectif final de l'étude étant de proposer aux éleveurs un type génétique de vaches plus résistantes aux infections et meilleures « mobilisatrices ». Les taureaux d'insémination des principales races bovines françaises disposent d'estimations de la valeur génétique de différents caractères (index), représentatifs de la prédisposition génétique qu'ils transmettent à leurs filles pour chaque caractère. Ces index sont aussi disponibles pour les femelles grâce à la connaissance de leur génome. La sélection consiste à choisir les meilleurs reproducteurs (mâles et femelles) sur la base de leurs index. Les deux aspects de santé de la mamelle et de mobilisation corporelle sont actuellement pris en compte dans cette sélection avec un index « Santé de la Mamelle » mis à disposition des éleveurs bovins laitiers depuis 2012 et un index "Etat corporel" depuis 2010.

Pour améliorer la sélection des animaux sur un caractère, il est nécessaire d'augmenter la précision de l'estimation de la valeur génétique des animaux pour ce caractère. Les index sont calculés grâce à la variabilité génétique qui existe entre individus au niveau du génome (prédisposition génétique) et des performances enregistrées pour un caractère donné (par exemple un nombre de mammites observées pendant la lactation). Dans notre étude, pour gagner en précision d'index et comprendre l'origine de la variabilité génétique de la résistance aux mammites et de la mobilisation des réserves corporelles, les objectifs sont les suivants :

- 1) valider l'effet de la sélection sur ces caractères, c.-à-d. l'amélioration réelle de la performance par la génétique, dans un troupeau dédié,
- 2) caractériser précisément les régions du génome déjà connues pour avoir un effet sur les caractères et ainsi identifier des mutations causales,
- 3) identifier les causes biologiques de résistance aux mammites et de mobilisation, et donc potentiellement mettre en évidence de nouveaux mécanismes et/ou régions du génome,
- 4) rechercher de nouveaux prédicteurs indirects et précoces de mammite facilement utilisables en ferme, à la fois pour apporter de la précision aux index existants (ou en créer de nouveaux) et éventuellement pour créer un outil de détection d'animaux à problème pour l'éleveur.

L'introduction d'une grande variabilité génétique dans un troupeau bovin est nécessaire pour remplir ces objectifs dans les deux principales races laitières françaises, Prim'Holstein et Normande. Cette variabilité est apportée par une sélection divergente à partir de groupes de taureaux d'insémination ayant des index « santé de la mamelle » et « état corporel » (en Holstein seulement) très contrastés. Les lignées divergentes sont procréées par transfert embryonnaire ou par insémination, comme dans les élevages classiques.

Les conséquences de la variabilité génétique sur la production, la composition du lait, l'état de la mamelle et la mobilisation corporelle seront estimées par l'analyse d'échantillons de lait et de sang, par des mesures enregistrées par l'automate de traite, par des pesées en sortie de traite et par des notations visuelles. Les échantillons de lait seront prélevés lors de la traite soit de manière classique par prélèvement automatique par la machine à traire, soit de manière manuelle par quartier lors d'une mammite. Ces prélèvements de lait ne demanderont aucune autre intervention particulière sur les animaux.

Le principe des 3R a été pris en compte dans la construction du projet :

- Remplacement : Les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire, de culture d'organe ou dans une autre espèce.
- Réduction : Avec le souhait de ne pas choisir des taureaux trop détériorateurs pour la santé de la mamelle, pour obtenir une variabilité suffisante sur les caractères étudiés, et donc des analyses statistiques significatives, il est nécessaire d'avoir une vingtaine de couples de parents différents (par race) ayant chacun 10 filles ou petites filles en première lactation. Ce projet porte sur la génération des petites filles, soit environ 250 femelles sur 3 voire 4 campagnes.
- Raffinement : Afin de minimiser la douleur, les prises de sang nécessaires au protocole seront réalisées au niveau de la queue des animaux, peu fréquentes, pour des volumes ne dépassant pas 2\*6ml et espacées d'au moins 24h. Les conditions d'hébergement, d'alimentation, de prophylaxie et de traitement des animaux ne sont pas modifiées par la mise en oeuvre du projet.

6451. Plusieurs études se sont intéressées au syndrome métabolique dans le but de mettre en place des traitements médicamenteux efficaces permettant de lutter contre l'augmentation inquiétante de ce fléau et de prévenir ses complications cardiovasculaires. Cependant, peu d'entre elles, se sont intéressées à l'évaluation de la fonction cardiaque globale lors du syndrome métabolique et du rôle de la modification de la voie du GMPc dans la mise en place et la progression des altérations associées à ce syndrome. Nos travaux récents ont permis d'observer des effets cardiovasculaires protecteurs chez un modèle animal atteint de syndrome métabolique après traitement chronique par un inhibiteur des phosphodiésterases de type 5, spécifiques de la dégradation du GMPc. Ces observations nous ont permis, de ce fait, d'émettre l'hypothèse que l'augmentation du taux cellulaire en GMPc pourrait affecter favorablement le développement du syndrome métabolique et serait donc une option thérapeutique envisageable pour maintenir et/ou limiter les complications cardiovasculaires qui lui sont associées. C'est la raison pour laquelle, nous souhaiterions étudier la modification de la voie du GMPc par l'utilisation d'activateurs directs tels que les activateurs de la guanylatecyclase soluble (GCs), une classe thérapeutique peu explorée dans le syndrome métabolique.

Il est largement documenté que les différentes composantes du syndrome métabolique constituent des facteurs d'agression de l'endothélium qui favorisent la baisse de la biodisponibilité en NO, soit par inhibition de sa synthèse, soit par augmentation de sa dégradation limitant ainsi la production du GMPc et empêchant les vaisseaux de se relaxer. Cet état de dysfonction endothéliale est une des conditions favorisantes pour le développement des complications vasculaires et cardiaques. Les activateurs directs de la GCs permettent de pallier le déficit en NO en restaurant la voie GCs-GMPc ce qui conduit à l'augmentation du taux basal en GMPc et au rétablissement de la fonction relaxante des vaisseaux même en cas de dysfonction endothéliale. L'intérêt majeur de ces molécules réside dans leur indépendance vis-à-vis du NO. C'est donc un avantage crucial par rapport aux molécules ciblant le GMPc qui, elles, sont dépendantes du taux de NO endogène. En effet, lorsque le taux de NO endogène est faible, le fait d'empêcher la dégradation du GMPc n'engendre pas d'effet bénéfique suffisant.



Ce projet sera consacré à évaluer chez le rat spontanément hypertendu (SHR) soumis à un régime hypercalorique (RHC) de type « cafétéria », les effets de l'administration à long terme d'un activateur direct de la voie du GMPc et d'un agoniste  $\beta_3$  adrénergique (connu pour ses propriétés lipolytiques et stimulantes de la production de GMPc) sur :

- Les modifications de l'indice de masse corporelle, de glycémie, et de la pression artérielle associées au syndrome métabolique  
- La modification de l'activité cardiaque globale ainsi que la modification de la réactivité vasculaire par une approche *ex vivo* sur cœur isolé et perfusé et sur des aortes isolées

D'autre part, de nombreux travaux de recherche ont montré que la dysbiose intestinale serait à l'origine des maladies métaboliques. Une partie du projet sera donc consacrée à l'étude de la modification du microbiote intestinal associée au syndrome métabolique par analyse des selles et à l'étude de l'impact de l'administration chronique des traitements pharmacologiques sur la composition du microbiote intestinal.

Pour cela, 5 groupes de 12 rats (soit un total de 60) sont disposés comme suit :

- 1) un groupe témoin de rats SHR
- 2) un groupe de rats SHR soumis à un RHC ;
- 3) un groupe de rats SHR soumis à un RHC traités avec un activateur de la guanylatecyclase (2 mg/kg/j) ;
- 4) un groupe de rats SHR soumis à un RHC traités avec un agoniste  $\beta_3$ -adrénergique (5 mg/kg/j) ;
- 5) un groupe de rats SHR soumis à un RHC traités avec un activateur de la guanylatecyclase associé à un agoniste  $\beta_3$ -adrénergique.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R. Le modèle du syndrome métabolique induit par un RHC chez le rat SHR est désormais maîtrisé dans notre équipe. On ne peut envisager d'étudier exclusivement par des approches *in vitro* sa physiopathologie et les conséquences cardiovasculaires qui lui sont associées. De plus, il n'existe pas de modélisation mathématique ou *in silico* qui permet d'évaluer l'effet de traitements dans ce domaine. Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude à l'aide d'une grille de score adaptée pour le rat. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

6452. Ces travaux pratiques (TP) chez le rat sont destinés à des étudiants pour lesquels le Programme Pédagogique de formation prévoit la mise en œuvre de protocoles expérimentaux *in vivo* afin d'étudier l'activité pharmacologique de grandes classes thérapeutiques tels que les anti-inflammatoires.

La formation dispensée à ces étudiants peut conduire à des métiers en lien avec le domaine de l'expérimentation animale. Dans ce contexte, les étudiants doivent acquérir un savoir-faire pour participer aux essais chez l'animal vigile et être en mesure de réaliser entre autres les traitements et les observations cliniques des animaux afin de pouvoir candidater sur les postes proposés par les organismes de recherche.

D'autre part, cet enseignement pratique participe à une meilleure orientation de nos étudiants par la découverte concrète des exigences et responsabilités liées à l'utilisation de l'animal.

Les objectifs pédagogiques sont :

- Mettre en œuvre un protocole expérimental permettant d'évaluer selon une relation dose/effet l'activité pharmacologique d'un médicament anti-inflammatoire sur un modèle animal.
- Favoriser un bon apprentissage de la manipulation du rat par répétition de la préhension et de la contention de l'animal au cours de ce TP : répartition des animaux par lot après randomisation, mesures du volume des pattes avant et après traitement, administrations par voies intrapéritonéale et aponévrose plantaire.

Remplacement : Dans le cadre de la formation de nos étudiants, le Programme Pédagogique prévoit, l'évaluation en TP de l'activité pharmacologique de molécules médicamenteuses de référence sur des modèles animaux et la mise en évidence de relation dose/effet par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux.

Ce TP doit permettre d'une part de mettre en évidence l'effet/dose de la molécule médicamenteuse étudiée sur ce modèle animal et d'autre part un bon apprentissage par nos étudiants de la manipulation du rat vigile (contention, administration de substances).

Le Programme Pédagogique précise pour nos étudiants que l'un des prolongements possibles à cette formation en pharmacologie *in vivo* est l'habilitation à participer à des expérimentations animales de niveau 2 (formation réglementaire niveau praticien) (formation que nous proposons aux étudiants intéressés).

Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan technique (manipulation de l'animal vigile, administration de substances...) que sur le plan pharmacologique (évaluation *in vivo* des effets de la molécule étudiée).

Réduction : Une séance de TP s'adresse en général à 2 trinômes d'étudiants et est reproduite 8 fois pour satisfaire à la formation de tous les étudiants d'une promotion dont l'effectif peut atteindre 50 étudiants.

Pour chaque séance, un enseignant encadrera les 2 trinômes d'étudiants et réalisera sur un animal la démonstration des gestes techniques.

Par étudiant, 1 rat sera utilisé pour cette étude. Il recevra par voie intrapéritonéale une dose de l'anti-inflammatoire en traitement préventif (indométacine) suivie d'une administration de l'agent inflammatoire (carragénine) sous l'aponévrose plantaire.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, seules 2 doses de l'anti-inflammatoire (1 dose/ trinôme d'étudiants) seront testées pour mettre en évidence une relation dose/effet de l'indométacine. Cette analyse sera réalisée en regroupant à chaque séance les valeurs obtenues par les 2 trinômes d'étudiants.

D'anciens résultats (3 doses et un lot contrôle) seront fournis aux étudiants pour déterminer la dose efficace 50 de l'anti-inflammatoire (dose réduisant de moitié l'œdème induit par la carragénine).

De plus, les rats utilisés dans ce TP proviendront de notre propre élevage et afin de limiter au maximum la présence d'animaux surnuméraires, des rats mâles et femelles seront utilisés indifféremment tout en respectant l'attribution d'animaux d'un même sexe pour une séance.

Par année, pour ce TP, 54 rats seront utilisés se répartissant ainsi :

1 rat par séance de TP et réutilisé au cours d'une seconde séance à 1 semaine d'intervalle pour la démonstration de la technique d'administration sous l'aponévrose plantaire (patte droite 1ère séance, patte gauche 2ème séance) (soit 4 rats).

1 rat par étudiant sera utilisé pour cette étude pharmacologique soit 50 animaux pour 50 étudiants.

Ainsi 54 rats/an et 270 rats sur 5 ans seront nécessaires pour 250 étudiants. Ce chiffre sera revu à la baisse en cas d'effectif inférieur à 250 étudiants.

Raffinement : Les animaux seront hébergés par groupes socialement harmonieux, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (tunnel en plastique noir et bâtonnet en bois à ronger ou noix). Préalablement aux séances de TP, les animaux seront habitués à la préhension et à la contention dans le but de limiter leur stress lors de leur utilisation par les étudiants.

Tous les animaux de l'étude seront traités par un antalgique et l'anti-inflammatoire avant l'administration de la carragénine. Il n'y aura pas de lot contrôle (non protégé par l'anti-inflammatoire). Les animaux de démonstration recevront une injection de sérum physiologique au lieu de la carragénine sous aponévrose plantaire et seront également traités par un antalgique.

6453. Cette séance de travaux pratiques (TP) chez la souris est destinée à des étudiants dont la formation peut conduire à des métiers en lien avec le domaine de l'expérimentation animale. Dans ce contexte, les étudiants doivent acquérir un savoir-faire pour participer aux essais chez l'animal vigile et être en mesure de réaliser entre autres les traitements et les observations cliniques des animaux, afin de pouvoir candidater sur les postes proposés par les organismes de recherche.

D'autre part, cet enseignement pratique participe à une meilleure orientation de nos étudiants par la découverte concrète des exigences et responsabilités liées à l'utilisation de l'animal.

Les objectifs pédagogiques de ces TP sont :

- Mettre en pratique l'enseignement théorique d'un point de vue pharmacologique concernant les effets et le mécanisme d'action des substances étudiées sur le système nerveux parasymphatique et d'un point de vue éthique vis-à-vis de l'utilisation de l'animal en expérimentation.

- Mettre en application un protocole expérimental de pharmacologie et restituer les résultats obtenus, comme demandé dans le programme pédagogique.

- Pratiquer la technique d'administration par voie orale chez la souris vigile, voie couramment utilisée pour tester certaines classes de médicaments. Éthiquement, cette voie d'administration nécessite une maîtrise correcte de la contention de l'animal, ainsi 2 séances de manipulation de la souris vigile auront été réalisées au cours du trimestre précédent. Par ailleurs, préalablement, une vidéo aura été présentée aux étudiants au cours de travaux dirigés afin de les sensibiliser à cette technique.

- Quantifier les effets de l'oxotrémorine (molécule parasymphatomimétique) ainsi que ceux de son interaction avec l'atropine (molécule antagoniste) sur la température rectale et observer avec attention les animaux afin de mettre en évidence la symptomatologie clinique induite par une faible dose d'oxotrémorine.

- Savoir concevoir un tableau de recueil de données, indispensable à un bon déroulement du protocole et mettre en évidence l'intérêt de ce document sur la traçabilité des données expérimentales incluant les signes cliniques observés chez les animaux.

# Remplacement : Dans le cadre de la formation de nos étudiants, le programme pédagogique prévoit, en pharmacologie, l'évaluation *in vivo* des effets et du mode d'action de molécules de référence par la mise en œuvre de protocoles expérimentaux.

Ce TP doit permettre d'une part l'apprentissage par nos étudiants des techniques d'administration de substances chez l'animal vigile et d'autre part d'illustrer le mécanisme d'action des médicaments mais également leur impact sur la physiopathologie et enfin de quantifier les effets des molécules étudiées.

Par ailleurs le programme pédagogique précise pour nos étudiants que l'un des prolongements possibles à cette formation en pharmacologie *in vivo* est l'habilitation à participer à des expérimentations animales de niveau 2 (formation réglementaire niveau praticien) (formation que nous proposons aux étudiants intéressés).

Il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de remplacement permettant une formation appropriée de nos étudiants tant sur le plan technique (manipulation et administration de substances chez l'animal vigile) que sur le plan pharmacologique (observation et quantification des effets des substances étudiées).

# Réduction : Une séance de TP s'adresse en général à 2 trinômes d'étudiants et est reproduite 8 fois pour satisfaire à l'apprentissage de tous les étudiants d'une promotion dont l'effectif peut atteindre 50 étudiants.

Pour chaque séance un enseignant encadrera les 2 trinômes d'étudiants et réalisera sur un animal la démonstration de la technique d'administration par voie orale et celle de la mesure de la température rectale.

Chaque étudiant, sous le contrôle de l'enseignant, apprendra la technique d'administration par voie orale sur 1 souris qui ne sera pas intégrée dans l'étude pharmacologique pour des raisons d'éthique, afin de limiter les gestes maladroits sur la même souris.

Pour l'étude pharmacologique, 2 souris seront utilisées par étudiant chacune recevant un traitement différent soit le véhicule de l'atropine et l'oxotrémorine (lot contrôle) soit la molécule antagoniste (atropine) et l'oxotrémorine (lot expérimental).

Pour l'analyse des résultats, les valeurs obtenues à chaque séance par les 2 trinômes d'étudiants seront regroupées.

Afin de réduire de moitié le nombre d'animaux utilisés, les animaux issus d'une séance de TP seront réutilisés environ une semaine plus tard lors d'une seconde séance.

Par année, pour ce TP, 81 souris seront utilisées ainsi :

- 2 souris utilisées par l'enseignant pour la démonstration des gestes techniques.

- 1 souris par étudiant sera utilisée pour l'apprentissage de l'administration par voie orale. Elle sera réutilisée environ une semaine plus tard. Ainsi 25 animaux pour 50 étudiants seront nécessaires pour cet apprentissage.
- 2 souris supplémentaires pour pallier aux éventuels échecs de la technique d'administration par voie orale.
- 2 souris par étudiant seront utilisées pour l'étude pharmacologique. Elles seront réutilisées une semaine plus tard. Ainsi 50 animaux pour 50 étudiants seront nécessaires pour cette étude.
- 2 souris supplémentaires en cas d'anomalies lors de l'étude.

Sur 5 ans, pour ce TP, 405 souris seront nécessaires pour 250 étudiants. Ce chiffre sera revu à la baisse en cas d'effectif inférieur à 50 étudiants.

# Raffinement : les animaux seront hébergés par groupes socialement harmonieux de 12 animaux maximum, en fonction de la taille de la cage et du poids des animaux, et en présence d'un enrichissement comprenant 2 éléments (papier absorbant et une petite maison soit en polycarbonate soit en carton).

Les mêmes animaux étant utilisés sur 2 séances de TP et l'atropine s'opposant aux effets de l'oxotremorine, les souris témoin de la 1ère séance seront incluses dans le lot expérimental lors de la 2ème séance et vice-versa afin que chaque animal ne soit exposé qu'une fois à l'oxotremorine seule.

La dose d'oxotremorine choisie induira une faible symptomatologie clinique. Les effets pour des doses supérieures seront présentés aux étudiants à partir d'une vidéo.

6454. La maladie de Stargardt est la plus fréquente des dégénérescences congénitales juvéniles maculaires, avec une prévalence de 1-8000/10000 personnes. La couche la plus interne de l'œil, la rétine, est la structure responsable de la transmission de l'information lumineuse de l'environnement au cortex visuel par le nerf optique. La macula, région rétinienne riche en récepteurs cônes, correspond à la partie de la rétine principalement affectée dans cette affection. Les cônes sont nécessaires à la vision pendant la journée (diurne) et c'est la perte de ce type de cellules qui entraîne la cécité lors de la maladie de Stargardt.

Les photopigments, générés par la vitamine-A et la protéine opsine, rendent les photorécepteurs sensibles à la lumière. Ces pigments se trouvent dans les segments externes des photorécepteurs où ils sont chimiquement transformés par l'énergie lumineuse. Leur transformation génère des signaux qui sont à leur tour transformés en information électrique transmise au cortex visuel et interprétée en images. Ce processus, appelé phototransduction, crée également des sous-produits toxiques dérivés de la vitamine-A, qui peuvent s'accumuler dans les photorécepteurs. La protéine ABCA4 est nécessaire au transport de ces produits toxiques de sorte qu'ils puissent être métabolisés dans les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), une couche de cellules indispensables à la fonction et à la survie des photorécepteurs. La maladie de Stargardt de type 1 (STGD1) est provoquée le plus souvent par des mutations faux-sens dans le gène ABCA4 qui conduisent à une accumulation des produits toxiques et à la mort des cellules photorécepteurs et de l'EPR. Actuellement il n'y a pas de traitement pour la maladie de Stargardt.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée de la façon suivante :

#### 1) Remplacement :

Pour mieux comprendre les mécanismes pathogéniques de la maladie et pour évaluer de nouvelles pistes thérapeutiques il est nécessaire de pouvoir étudier de bons modèles animaux. Les modèles animaux pour STGD1 sont actuellement limités à des souris « knockout » qui expriment un phénotype peu sévère dans lequel le gène ABCA4 est complètement inactivé et qui présentent donc une pertinence clinique limitée. Pour ces raisons, il a été décidé de créer un rat transgénique porteur de la mutation la plus fréquente de la maladie de Stargardt, la mutation G1961E dans le gène ABCA4 (modèle KI). De plus, la génération d'un rat transgénique dans lequel le gène ABCA4 sera inactivé (modèle KO) nous permettra d'avoir un témoin négatif pour l'expression d'ABCA4 et un témoin positif pour un phénotype pathologique.

Une caractérisation exhaustive de la structure, de la fonction et de la biochimie de la rétine de ces modèles est le but fixé de notre projet. Dans l'avenir, les deux modèles nous permettront de tester le potentiel thérapeutique de la correction de gène en utilisant le système CRISPR/Cas9.

#### 2) Réduction :

La détermination du nombre total d'animaux a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience d'une étude similaire de caractérisation d'une lignée de rats. La constitution des groupes d'animaux devrait assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure.

Dans ce projet, afin de couvrir l'ensemble des besoins, nous estimons, grâce à notre expérience en termes d'établissement et maintien de lignées chez le rat, devoir mettre en place environ 28 reproductions pour chacune des lignées développées (KI et KO). Le nombre d'animaux reproducteurs utilisés au cours de ce projet sera donc au maximum de 56 (28 par lignée), plus probablement aux alentours de 30 au total. Ensuite, 309 animaux issus de ces reproductions (n=84 rats pour chacun des génotypes ABCA4WT/WT, ABCA4E/E, et ABCA4-/- et n=57 rats pour le génotype ABCA4WT/E) seront nécessaires pour réaliser l'étude de caractérisation du phénotype. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'étude, et en considérant que la lignée générera des portées de taille standard.

#### 3) Raffinement :

Au cours de ce projet, le souci du bien-être animal passera notamment par :

- une période d'acclimatation d'au minimum 5 à 7 jours au sein de l'animalerie avant l'entrée des animaux en "protocole" ou en reproduction
- de bonnes conditions d'hébergement (soins, enrichissements du milieu)
- un suivi régulier des animaux (observations bi-quotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)
- l'instauration de points limites pertinents et précoces

- la mise en place de mesures adaptées (anesthésie, analgésie si nécessaire : injection en sous cutanée de buprénorphine à 0.05 mg/kg ou euthanasie par des méthodes reconnues)

Le respect du bien-être animal au sein de la structure où sera mené le projet passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi par observation biquotidienne des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou euthanasie si pas d'autre alternative).

Afin d'améliorer la réactivité du personnel technique animalier, une grille de scoring de la douleur est mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.

6455. Chez l'homme tout comme chez l'animal, le cartilage de l'articulation du genou (ou grasset) peut être confronté à diverses pathologies traumatiques (lésions liées au sport, à l'activité physique), inflammatoires (arthrites) ou dégénératives (arthrose), conduisant à des pertes de substances (défets) focales. Le nombre de personnes souffrant d'arthrose ne cesse d'augmenter avec le vieillissement des populations.

Le cartilage est un tissu qui se régénère peu et qui cicatrise difficilement et la présence de défauts conduit à une dégénérescence ultérieure du cartilage, d'où la nécessité de trouver des traitements. Des traitements tel que des anti-inflammatoires ou analgésiques servent à soulager la douleur pendant un certain temps mais ne permettent pas de guérir ou d'arrêter la progression de la maladie. Ces pathologies peuvent engendrer un réel handicap dans la vie de tous les jours.

De ce fait, différentes approches sont aujourd'hui expérimentées pour tenter de régénérer le tissu cartilagineux des personnes atteintes par ces maladies, notamment l'utilisation de biomatériaux. Ils existent sous forme de mousse, liquide visqueux, hydrogel, etc. et peuvent être associés à des chondrocytes (cellules principales du cartilage qui participent à la synthèse et au maintien du tissu cartilagineux). Les résultats de tests *in vitro* montrent que les chondrocytes sont capables de proliférer et de synthétiser du cartilage lorsqu'ils sont intégrés dans une matrice adaptée. Ces essais *in vitro* sont très prometteurs en matière de régénération tissulaire du cartilage.

Remplacement :

Néanmoins, les conditions mécaniques et chimiques environnantes les chondrocytes diffèrent considérablement entre un modèle cellulaire et une articulation réelle. C'est pourquoi, afin de vérifier l'efficacité et d'assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'un biomatériau chez l'Homme, des tests *in vivo* doivent être obligatoirement menés, sur un modèle pertinent. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*.

Le primate non humain (PNH) est une espèce de choix, couramment utilisée en recherche biomédicale ; ses nombreuses similitudes avec l'Homme (biologie de la cicatrisation cartilagineuse, contraintes mécaniques exercées au niveau du cartilage du genou, liées à la bipédie) permettraient de prédire l'évolution du biomatériau chez l'Homme. Le but général de ce projet est donc de développer un modèle primate pour l'évaluation de traitements des lésions cartilagineuses articulaires chez l'Homme, avant leur utilisation en clinique et de vérifier la manière dont l'implant cartilagineux et ses éventuels composants cellulaires répondent aux conditions mécaniques et chimiques chez un être vivant. Pour cela, les biomatériaux seront implantés dans le cartilage des grassets.

Réduction :

Pour ce projet, il est prévu d'utiliser 12 macaques cynomolgus par an, soit un total de 60 animaux pour 5 ans. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme, notamment en créant plusieurs défauts cartilagineux au niveau des grassets d'un même animal pour ainsi tester différents implants sur un même animal et utiliser un animal comme son propre contrôle.

Raffinement

Un examen vétérinaire sera effectué avant de commencer chaque procédure. La douleur liée à la procédure chirurgicale sera prise en compte et supprimée au moyen d'analgésiques puissants (anti-inflammatoires non stéroïdiens et morphiniques) administrés de façon préventive préopératoire et postopératoire. Tout au long de l'étude, les animaux seront suivis individuellement afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les interventions chirurgicales. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

6456. Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. Ce sont elles qui nous protègent des hémorragies en cas de blessures ou de lésions vasculaires. Pour faire l'hémostase, les plaquettes doivent être fonctionnelles et en nombre suffisant. Chez l'homme le nombre normal de plaquettes circulantes est compris entre 150 000 et 450 000 par  $\mu\text{L}$  de sang. Au cours d'une chimiothérapie, d'un traitement par radiation, d'une infection ou suite à un accident, le taux de plaquettes circulantes peut chuter (thrombopénie). En dessous de 30 000 plaquettes par  $\mu\text{L}$  de sang, le risque hémorragique est important et peut mettre en danger la vie du patient. Il existe aussi des maladies où les plaquettes ont perdu leur capacité à colmater une brèche vasculaire (thrombopathie). Les personnes atteintes par ces dysfonctionnements sont sujettes à des épisodes hémorragiques lors de traumatismes ou lors d'intervention chirurgicale.

Afin de circonscrire ces risques graves pouvant conduire au décès du patient, une transfusion de plaquettes est souvent nécessaire. Les plaquettes transfusionnelles sont fournies par les donneurs de sang. L'approvisionnement en plaquettes est un des grands défis des centres de transfusion pour les années à venir. La solution pourrait être dans le développement de la production de plaquettes *in vitro*.

Pour être efficaces les plaquettes doivent rester dans la circulation sanguine. Cet événement est mesuré par le rendement transfusionnel plaquettaire (RTp). Elles doivent aussi être fonctionnelles, c'est-à-dire capables de colmater une brèche vasculaire, ce qui peut être évalué par la réduction du temps nécessaire à l'arrêt d'un saignement et à la perte sanguine.

Selon les pathologies, les quantités de plaquettes nécessaires à faire l'hémostase ne sont pas identiques. Des modèles animaux de ces différentes pathologies sont développés chez la souris et pourront permettre d'évaluer *in vivo* ces nouveaux produits.

Nous souhaitons ici établir chez la souris un référentiel de la quantité de plaquettes nécessaires à transfuser dans différentes pathologies thrombopéniques ou thrombopathiques. Nous allons réaliser des transfusions dans 8 modèles murins de syndromes hémorragiques puis nous allons mesurer le RTp, la correction du temps de saignement, la perte sanguine. La fonctionnalité des plaquettes pouvant dépendre de la concentration et de la cinétique d'injection, différentes méthodes de transfusion vont être étudiées. Les données de RTp et de perte sanguine seront analysées par un test d'analyse de variance ANOVA suivi d'un post test de Bonferroni afin de pouvoir comparer les moyennes de chaque groupe. Pour les temps de saignement, on utilisera un 'log rang test' qui permet d'analyser les données censurées.

Les souris qui ont un risque hémorragique n'ont pas de problèmes de saignement tant que l'intégrité vasculaire est maintenue. Par contre l'hémorragie sera mise en évidence au moment de la réalisation du test de saignement à la queue.

Remplacer : L'efficacité d'une transfusion implique des régulations mettant en jeu, les vaisseaux et le flux sanguin, les mécanismes immunitaires et d'inflammation, les régulations nerveuses. Ces interconnexions complexes ne peuvent être étudiées dans l'état des connaissances actuelles que dans des modèles *in vivo*.

Réduire : Afin de limiter le nombre d'animaux nécessaires à ce projet, l'efficacité des différentes méthodes de transfusion sera mesurée dans un premier temps par le calcul du RTp sur un petit nombre d'animaux. La meilleure méthode sera ensuite retenue pour établir la quantité de plaquettes nécessaires à la correction du temps de saignement dans les différents modèles. De plus le temps de saignement et la perte sanguine seront réalisés de manière simultanée sur un même animal afin de diviser par 2 la quantité totale d'animaux nécessaires. Posséder un référentiel bien caractérisé nous permettra, lors des prochains projets, d'estimer de manière précise la quantité de plaquettes à transfuser et ainsi nous affranchir d'expériences de mise au point.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 2260 souris.

Raffiner : Les animaux sont hébergés dans des cages enrichies avec du coton compressé et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature. Elles pourront ainsi compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux sont mis entre 2 et 6 par cage afin de concilier leurs besoins sociaux et la réduction de la fréquence des changes avec le stress y afférant. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Toutes les procédures seront faites avec des animaux anesthésiés et traités contre la douleur. A leur réveil les animaux seront particulièrement surveillés afin de détecter toute manifestation d'inconfort.

6457. Dans notre laboratoire, nous nous intéressons essentiellement au stade érythrocytaire du cycle parasitaire du plasmodium, c'est-à-dire comprendre le mécanisme mis en jeu par le parasite pour s'attacher au globule rouge et pénétrer à l'intérieur *via* la membrane de celui-ci pour s'y développer, se multiplier et ensuite le faire éclater pour libérer plusieurs formes infectantes qui vont à nouveau coloniser des globules rouges sains. Cette invasion met en jeu le parasite, le plasmodium et sa cible, le globule rouge ou dans le cas de *plasmodium vivax*, le réticulocyte. Nous avons identifié plusieurs protéines parasitaires exprimées par le parasite lors de l'attachement et l'invasion du globule rouge contre lesquelles nous allons fabriquer des anticorps que nous testerons dans des tests d'inhibition de croissance parasitaire *in vitro* afin d'identifier la ou les protéines induisant des anticorps capables de bloquer l'invasion du parasite.

La production de ces anticorps ne peut se faire qu'en immunisant un animal. Nous avons choisis la souris BALB/c car elle permet d'obtenir des sérums immuns de bonne qualité. Dans un deuxième temps nous vaccinerons des souris C57/BL6 pour tester l'efficacité du challenge avec les sporozoïtes, forme infectante lors du repas sanguin du moustique, de la souche de *Plasmodium P Berghei*, souche murine qui exprime la PfCSP. Nous savons que le bruit de fond des anticorps obtenus est quasi nul sur les globules rouges sains humains contrairement aux sérums de lapins qui avant toute immunisation, reconnaissent des protéines érythrocytaires. Nous utiliserons un protocole d'immunisation à la fois très efficace (pour réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'anticorps de bonne qualité) et entraînant des effets secondaires modérés pour les animaux (principalement une réaction inflammatoire au point d'injection).

Pour réduire le nombre de souris, nous nous proposons de faire des combinaisons de 3 antigènes dans le même inoculum.

Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 445 souris sur une période de 5 ans dans une seule procédure de sévérité modérée.

Les animaux feront l'objet d'une surveillance fréquente pour identifier rapidement des dommages plus importants correspondant à des points limites. Les animaux seront alors euthanasiés.

Dans un deuxième temps, nous testerons les adjuvants utilisables chez l'homme donc moins inflammatoires pour la souris dans les mêmes conditions que précédemment et testerons ces immuns sérums sur une culture cellulaire afin de définir l'antigène plasmodial indispensable dans l'invasion.

Ce projet nous permettra d'identifier des protéines qui pourraient être à la base de nouveaux vaccins contre le paludisme.

6458. L'impulsivité est un trait de personnalité désignant l'incapacité à réprimer certains comportements rapides, risqués ou peu appropriés. Ce déficit du contrôle inhibiteur des impulsions est fréquemment observé dans de nombreuses pathologies neuropsychiatriques telles que l'hyperactivité et trouble de l'attention, le syndrome de Gilles de la Tourette et les addictions aux drogues. Un ensemble de données convergentes suggèrent que différentes formes d'impulsivité seraient dues à un dysfonctionnement des circuits neuronaux liant le cortex frontal à un ensemble sous-cortical appelé les Ganglions de la Base (GB).

Pour le moment, cependant, cette relation est loin d'être solidement établie, en particulier en ce qui concerne la contribution spécifique de sous-territoires des GB dans la genèse des différents comportements impulsifs. Une meilleure caractérisation fonctionnelle des territoires sous-corticaux nous apparaît un enjeu stratégique majeur pour l'optimisation de la prise en charge thérapeutique de ces multiples troubles du contrôle inhibiteur.

Les principaux objectifs de notre projet sont d'affiner et d'utiliser la méthode d'optogénétique chez le primate non-humain (PNH) afin (i) de déterminer les mécanismes neuronaux impliqués dans la genèse des différentes formes d'impulsivité, et (ii) de localiser les territoires et circuits des GB en relation avec la manifestation de ces troubles comportementaux.

Pour répondre à ces deux questions, un nombre limité de 4 *Macaca fascicularis* (réduction minimale pour mesurer la généralisation des effets) exposés à un ensemble d'approches expérimentales réversibles (procédures légères et modérées avec aucun effet néfaste permanent attendu) sera nécessaire. Dans un premier temps, 2 animaux seront utilisés pour le développement et la mise au point de la technique d'optogénétique chez le PNH. Cette méthode a pu démontrer ses pouvoirs d'investigation chez le rongeur, mais restent encore marginalement utilisée chez le PNH. Lorsque la transfection virale de la protéine sensible à la lumière et la réponse à la stimulation lumineuse seront effectives et reproductibles, 2 autres animaux seront alors intégrés à l'étude afin d'appliquer diverses perturbations réversibles de l'activité des GB pour induire des troubles comportementaux en lien avec l'impulsivité. Ces 2 derniers PNHs seront au préalable entraînés à effectuer une tâche comportementale permettant de détecter différentes formes d'impulsivité (cognitive, d'action et motivationnelle) qui pourraient être générées par la stimulation lumineuse des territoires d'intérêt dans les GB. Bien que l'optogénétique offre une spécificité d'action, des micro-stimulations électriques réversibles seront également appliquées dans les mêmes sites des GB pour comparer la puissance des modifications comportementales induites. Des enregistrements électrophysiologiques seront effectués pour contrôler le rôle fonctionnel des circuits impliqués et pour observer les modifications d'activité cellulaire lors des stimulations lumineuses.

Ce projet a été élaboré pour répondre à des questions touchant à la fois nos connaissances fondamentales sur le fonctionnement cérébral, sur la compréhension de pathologies neuropsychiatriques et le développement de nouvelles approches expérimentales tout en adoptant une stratégie de recherche respectueuse de la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement) préconisée pour une recherche sur l'animal à des fins scientifiques et cliniques. Comprendre le fonctionnement et l'implication de ces régions profondes du cerveau, généralement trop petites pour être étudiées par imagerie fonctionnelle chez l'homme, nécessite inévitablement une expérimentation animale. Le PNH n'est pas remplaçable par une autre espèce animale, de par la proximité anatomo-fonctionnelle avec l'homme des structures cérébrales étudiées ainsi que par le raffinement des modèles réversibles de troubles comportementaux que l'on a pu déjà induire sur cette espèce animale. Ce type d'expérimentation sur le *Macaca fascicularis* a déjà permis des avancées remarquables qui ont permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies associées à ces circuits sous-corticaux, telles que la maladie de Parkinson ou les Troubles Obsessionnels Compulsifs. Notre objectif est de permettre ce même développement pour lutter contre divers troubles neuropsychiatriques caractérisés par différentes formes d'impulsivité. Finalement, le raffinement de nos approches d'investigations sur cette espèce (anesthésie), l'utilisation de l'imagerie cérébrale pour localiser les territoires des structures étudiées (raffinement permettant l'obtention d'images sur animal vivant), la réversibilité des effets comportementaux produits ainsi que l'utilisation d'approches non-lésionnelles, nous permettent outre, le raffinement, de réduire le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être durant la phase expérimentale. En conformité avec la déclaration d'utilisation de vecteurs viraux auprès du ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, les animaux impliqués dans cette étude seront euthanasiés à terme, permettant ainsi de valider les méthodes expérimentales par l'analyse des tissus cérébraux.

6459. Nous avons montré un impact significatif d'une exposition chronique à de faibles doses de certains pesticides *in cellulo* sur la prolifération de lignées de cancer colorectal et *in vitro* sur les formes neurotoxiques associées aux maladies neurodégénératives (données confidentielles non publiées).

Notre objectif est d'évaluer l'impact d'une exposition chronique à de faibles doses de ces pesticides sur le cancer colorectal et la maladie d'Alzheimer.

La collaboration entre nos équipes spécialisées en cancers digestifs et maladies neurodégénératives, permet d'appliquer la règle des 3R :

1. Remplacement : nos données *in cellulo* et *in vitro* suggèrent un impact potentiel de ces pesticides *in vivo*.
2. Réduction : l'étude sera réalisée selon 3 phases sur un total de 510 souris (sauvages et transgéniques) pour étudier l'impact des pesticides sur les 2 maladies : la phase 1 (étude pilote) sera déterminante pour réajuster si nécessaire, les doses de pesticides et le nombre d'animaux afin que les données des phases 2 et 3 soient statistiquement valides.
3. Raffinement : les données publiées par les industriels n'indiquent aucune toxicité à la dose de 0.1ug/L (dose max autorisée dans l'eau potable par l'UE et dose max utilisée dans l'étude). Il n'est donc pas attendu de souffrance chez l'animal. Les animaux (10/lot ; 4/cage) seront hébergés sous surveillance quotidienne, dans un milieu enrichi, avec un accès illimité à la nourriture et à l'eau de boisson, avec ou sans pesticides.

6460. Les canaux ioniques et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont des protéines membranaires essentielles à la communication de nos cellules. Ces protéines sont impliquées dans de nombreuses pathologies telles que le diabète de type 2, l'épilepsie, les maladies cardiovasculaires, les désordres comportementaux. Elles sont également une cible majeure de médicaments agissant par exemple sur la douleur, le travail prématuré à l'accouchement, le rythme cardiaque. Les canaux ioniques génèrent de très petits courants électriques que nous savons mesurer. Ces mesures peuvent nous permettre de mieux comprendre leur fonctionnement et leur dysfonctionnement, et ainsi, mieux caractériser des pathologies et de trouver des solutions médicales

rationnelles. En parallèle, nous nous intéressons au développement d'applications biotechnologiques, notamment dans le diagnostic *in vitro*, le criblage primaire de candidats médicaments et la détection de perturbateurs endocriniens. Toutes les mesures des faibles courants effectuées dans l'ensemble de ces projets sont basées sur des techniques dites "électrophysiologiques" réalisées sur des "œufs" (ovocytes) de Xénope, gros batraciens sud-africains. Ces ovocytes sont des usines naturelles et se prête à l'étude très efficaces de production de protéines. Elles sont un système d'étude unique de par leur taille gigantesque pour des cellules (~1 mm de diamètre), permettant de les manipuler individuellement et de produire plusieurs protéines simultanément par micro-injection d'ARN (copie de gène codant pour les protéines) dans ces ovocytes.

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

Le nombre d'animaux a été réduit à un minimum nécessaire pour atteindre les objectifs de l'étude. Un total de 48 animaux sera utilisé. Sur le plan technique, le prélèvement hebdomadaire des ovocytes de Xénope s'effectue par opération chirurgicale sur animaux anesthésiés. L'état de santé des animaux est surveillé pour intervenir dès le moindre signe de souffrance. Des critères d'arrêt sont dans ce cas prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Les animaux sont nés et élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Pour améliorer le bien-être des animaux, les conditions d'hébergement sont enrichies de zones d'ombre et de tubes permettant aux animaux de se cacher et de s'isoler selon leur volonté.

6461. Les maladies cardio-vasculaires représentent l'une des premières causes de mortalité dans tous les pays industrialisés. En France, environ 120 000 personnes subissent un infarctus du myocarde, chaque année. Malgré une amélioration de la prise en charge de la crise, 10% décèdent rapidement et 18 000 personnes mourront dans l'année. De nouveaux médicaments sont nécessaires pour le traitement de la phase aiguë et pour la prévention des conséquences à long terme, à savoir le développement progressif d'une insuffisance cardiaque congestive. Dans ce domaine, la recherche de nouveaux traitements est initiée *in vitro*, sur des cellules humaines d'intérêt (cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires vasculaires...). Elle a pour objectif de fournir des indications sur la manière dont les nouveaux produits agissent sur les mécanismes/cibles impliqués dans les différentes phases de la pathologie. Cette étape *in vitro* permet de sélectionner les produits actifs. Comme aucun système cellulaire ou bio-informatique ne peut reproduire la complexité d'un organisme qui est le siège de régulations variées, complexes et pas nécessairement bien appréhendées, il devient incontournable de tester ces produits *in vivo*. Le risque d'échec *in vivo* sera limité puisque seuls les meilleurs produits actifs *in vitro* et *ex vivo* seront évalués. Enfin, la coordination entre toutes les spécialités impliquées dans les études (modélisation *in silico*, pharmacocinétique, formulation, biochimie), permettra de définir pour chaque nouveau candidat médicament une stratégie précise qui identifiera les études *in vivo* nécessaires et suffisantes, contribuant ainsi à réduire le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet décrit les procédures mises en place pour confirmer le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules dans les pathologies cardiovasculaires liées à l'insuffisance cardiaque. Dans une première étape, l'engagement de la cible thérapeutique visée par le traitement ainsi que les propriétés pharmacocinétiques des composés étudiés seront validés chez des animaux sains anesthésiés grâce à des évaluations hémodynamiques invasives basées (entre autres) sur l'étude de la pression artérielle, de la fonction ventriculaire, et de la fonction rénale. Dans une deuxième étape, les procédures envisagées seront menées sur des animaux sains, vigils et non restraints en utilisant essentiellement la technique de télémetrie afin de ne retenir que les meilleurs candidats médicaments dotés d'un profil mécanistique précis et ce en l'absence d'anesthésique. La troisième étape mettra en jeu des animaux porteurs d'une pathologie cardiaque induite ou spontanée, pour confirmer l'efficacité des traitements sur des rongeurs présentant une pathologie liée à l'insuffisance cardiaque. Cette dernière phase permettra de définir le profil d'efficacité thérapeutique des produits. Les modèles animaux présentant de fortes similitudes avec les pathologies cardiaques humaines seront privilégiés. Au cours de cette étape, en complément des moyens d'investigation déjà évoqués, il sera largement fait appel à des techniques permettant un suivi longitudinal des animaux telles que l'imagerie (échocardiographie et imagerie par tomographie), la mesure de la pression artérielle non invasive et les cages à métabolisme pour l'étude de la fonction rénale, et ce afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ce projet décrit également la stratégie mise en place pour assurer le suivi des souches pathologiques à phénotype inconnu afin de déterminer la fenêtre temporelle pendant laquelle il sera possible d'utiliser ces animaux en tant que modèle expérimental.

Les procédures sont mises en place avec le support du département de bio-statistiques pour l'élaboration du design expérimental, afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études (en fonction de l'objectif de l'étude, de son design, de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données) et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques. Le nombre maximal d'animaux qui devraient être utilisés dans le cadre de ce projet est de 20 000 rats, 20 000 souris et 1 400 cobayes sur 5 ans.

Les procédures décrites dans le projet sont validées par le comité d'éthique. Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations) et la prévention de la douleur et du stress. Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant la manipulation des animaux, et l'observation des signes cliniques fondamentaux. Des critères d'alarme spécifiques essentiellement basés sur les signes cliniques d'insuffisance cardiaque ont été clairement identifiés (dyspnée, prostration, perte de poids).

6462. Des études cliniques menées dans les années 50, complétées par des travaux expérimentaux sur des modèles animaux, ont montré que l'hippocampe est une structure cérébrale qui joue un rôle central dans certaines formes de mémoire, en particulier la mémoire épisodique et la mémoire spatiale. La principale théorie de la mémoire postule que les informations initialement codées par l'hippocampe sont progressivement transférées vers le cortex pour assurer un stockage à long terme. Ce processus est appelé « consolidation mnésique », et semble se produire tout particulièrement pendant le sommeil. Cette hypothèse fondatrice, proposée il y a vingt ans, avait inspiré de très nombreux travaux.

Nous avons récemment confirmé que les oscillations neuro-électriques de l'hippocampe jouent un rôle primordial dans la consolidation mnésique car elles reflètent la synchronisation et la coopération entre structures cérébrales. De plus, nos travaux ont montré comment ces interactions, cruciales pour la consolidation de la mémoire, ont lieu lors du sommeil qui suit l'apprentissage.

Un autre courant de recherche a mis en évidence qu'un réseau de régions cérébrales incluant l'hippocampe et le cortex préfrontal est impliqué dans la physiopathologie des troubles anxieux et joue un rôle majeur dans l'encodage et le traitement de signaux correspondant aux mémoires traumatiques. En effet ces traces mnésiques semblent être particulièrement impliquées dans le développement de troubles anxieux tels que le syndrome de stress post traumatique. Depuis 15 ans plusieurs études de neuro-imagerie ont mis en évidence l'interaction entre l'hippocampe et le cortex préfrontal dans le traitement des mémoires de trauma et dans le développement de l'anxiété pathologique et ces découvertes ont été confirmées par des travaux expérimentaux sur des modèles animaux permettant aussi de comprendre les mécanismes physiologiques et physiopathologiques sous-jacents.

Même si un nombre croissant d'études montre que les interactions entre ces structures jouent un rôle crucial dans les mécanismes de mémorisation émotionnelle qui sous-tendent l'anxiété pathologique, les dynamiques permettant ce dialogue hippocampe-cortex sont encore mal connues. Notre hypothèse de départ postule que l'hippocampe envoie des informations contextuelles au cortex préfrontal médian, permettant de déterminer le caractère sûr ou dangereux d'un environnement. Par conséquent, des dynamiques temporelles fines de communication entre l'hippocampe et le cortex préfrontal seraient à la base de l'acquisition, la consolidation, et le rappel des mémoires traumatiques, ce que nous avons montré pour la mémoire spatiale. Cette hypothèse est corroborée par des travaux publiés en juillet 2016, montrant pour la première fois l'existence d'un code temporel au sein du réseau neural du cortex préfrontal qui règle l'expression de la peur. Pour avancer sur notre compréhension de la physiopathologie des troubles anxieux il devient aujourd'hui primordial de connaître les dynamiques neurales permettant la formation et le traitement des mémoires traumatiques.

Nous évaluerons les performances d'apprentissage des rats pendant des tâches de conditionnement et d'extinction, et nous étudierons les modifications induites par cet apprentissage au niveau d'ensembles de neurones enregistrés simultanément dans l'hippocampe et le cortex préfrontal. Cette double approche comportementale et neurophysiologique nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de communication entre l'hippocampe et le cortex préfrontal impliqués dans le traitement des traces mnésiques liées aux traumatismes et la physiopathologie des troubles anxieux.

Étudier les dynamiques cérébrales sous-tendant la cognition nécessite l'utilisation de techniques *in vivo* permettant d'analyser l'activité neurale associée aux différents comportements et états émotionnels. Pour ces expériences, nous utiliserons des rats (70), qui constituent un modèle animal de référence pour l'étude des substrats neurales de la cognition et du comportement. Vu l'impossibilité de remplacer l'utilisation d'animaux pour l'étude des bases neurales du comportement, nous utilisons des techniques qui nous permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés. Les chirurgies se feront en conformité avec la réglementation et nous ferons particulièrement attention à la stratégie antalgique péri-opératoire pour réduire la souffrance des animaux. Nos technologies d'enregistrement de pointe permettent d'échantillonner les réponses de dizaines de neurones simultanément, dans le but de maximiser l'information obtenue pour chaque sujet. De plus, pour certaines expériences, notre stratégie expérimentale nous permettra de se servir des mêmes animaux pour les tests et les contrôles, ce qui diminuera ultérieurement leur nombre total.

La taille très réduite de nos lots de sujets nous donne la possibilité de soigner individuellement les animaux et nous permet de mettre en place plusieurs dispositifs visant à réduire au minimum leur stress. Ils seront quotidiennement manipulés par les expérimentateurs pour qu'ils soient habitués au contact humain et ceci permettra aussi un suivi intensif et soigné de leur état de santé et de stress ainsi que de mettre rapidement en place des contre-mesures si nécessaire. Les rats seront hébergés dans des cages plus grandes que celle d'une animalerie standard et celles-ci seront enrichies avec des objets pour leur permettre de faire des nids. Enfin nous enrichissons aussi le régime alimentaire des animaux en leur donnant de la nourriture variée.

6463. La rétinopathie diabétique est une complication du diabète qui atteint l'œil au niveau de la rétine et serait la première cause de cécité avant 65 ans. Dans cette maladie, les capillaires sanguins de la rétine sont détériorés, ils perdent leur étanchéité, leur perméabilité augmente, ce qui induit des hémorragies et des exsudats qui lèsent la rétine. La maladie peut évoluer vers une rétinopathie proliférative avec production anormale de nouveaux vaisseaux peu fonctionnels, des décollements de la rétine et des saignements dans le vitré (substance remplissant l'intérieur de l'œil). Un œdème au niveau de la macula, zone de la rétine essentielle pour la bonne acuité visuelle, peut survenir à tout moment et entraîner la perte de la vision.

Bien que chacun des modèles animaux du diabète ne reproduise pas l'ensemble des signes cliniques de la pathologie humaine, ils permettent de décortiquer les mécanismes impliqués dans la rétinopathie diabétique ou d'étudier de nouvelles cibles thérapeutiques. L'objectif du projet est la mise en place, au sein de l'établissement utilisateur, d'un modèle expérimental de rétinopathie diabétique avec augmentation de la perméabilité des vaisseaux chez le rongeur et le lapin afin de tester l'efficacité de traitements potentiels dans cette maladie.

Une stratégie pour reproduire la perméabilité vasculaire est d'utiliser un composant impliqué dans le mécanisme induisant la pathologie chez l'homme, en se basant sur les données de la littérature scientifique.



Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans, 11350 rats, 11350 souris, 11350 lapins âgés de minimum 6 semaines au début de l'étude. Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des animaux sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés, en groupe pour les rongeurs et individuellement pour les lapins, dans des cages de taille adaptée, un enrichissement est fourni pour améliorer le bien-être de l'animal. Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

6464. Avant de tester l'efficacité des candidats médicaments dans les modèles animaux de pathologies humaines (cancer, maladies inflammatoires) nous souhaitons déterminer la dose maximum tolérée par la souris durant 15 jours.

Notre objectif est donc d'évaluer la dose maximum de composé pharmacologique sans aucun effet indésirable pour l'animal avant de mesurer son efficacité.

L'analyse est basée sur la recherche des signes cliniques visibles ou de toute modification du comportement des animaux ceci en observant les animaux tous les jours et en mesurant le poids des animaux une fois par jour.

Dans le cas de la mise en évidence d'une perte de poids ou de signes cliniques l'expérience sera immédiatement arrêtée et l'animal sera euthanasié.

En effet, le protocole expérimental prend en compte l'impact potentiel sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier l'arrêt de l'expérience en cours.

En cas d'absence des signes cliniques, l'expérience est poursuivie jusqu'à la fin de protocole. Le dernier jour de protocole, l'animal est euthanasié. Le sang et les organes sont prélevés pour des études hématologiques et histologiques.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Du fait de l'absence de modèles alternatifs suffisamment intégrés et complexes pour permettre d'évaluer la biodisponibilité d'une molécule, qui met en jeu les mécanismes d'absorption, de distribution, de dégradation, de transport et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules, l'emploi de modèle animal est incontournable.

Réduire

Nous faisons une étude avec 6 souris par groupe ce qui est suffisant pour évaluer la dose maximale tolérée par la souris pour les futures études d'efficacité des candidats médicaments. En effet nos études antérieures ont montré que 6 souris par groupe est suffisant pour mettre en évidence des troubles liés aux candidats médicaments et ainsi nous permettre d'identifier la dose maximum tolérée *in vivo*.

L'étude d'un composé à trois doses nécessite 4 groupes de 6 souris soit 24 animaux répartis comme suit :

- 6 souris contrôle (solvant)
- 6 souris composé à dose faible
- 6 souris composé à dose intermédiaire
- 6 souris composé à dose forte

Il est prévu d'évaluer l'innocuité de 10 candidats médicaments par an (240 souris) sur une période de 5 ans soit un total de 1200 souris.

Raffiner

Seules les molécules présentant le meilleur rapport efficacité/innocuité *in vitro* seront étudiées *in vivo*.

De plus avant de démarrer le protocole *in vivo* nous faisons une série de vérification pour être sûr que le produit administré présente le profil réglementaire (compatibilité des excipients et pH) pour être administré à l'animal par voie orale. Si le produit ne répond pas à ces attentes il ne sera pas étudié *in vivo*.

Durant l'étude *in vivo* nous portons une attention particulière au bien-être de l'animal. Ils sont hébergés dans de grandes cages enrichies de coton dans une animalerie conventionnelle.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de poids et l'état général des animaux. Et un suivi de nourriture consommé une fois par semaine.

De plus, ils seront maintenus durant une période d'acclimatation d'une semaine pour une habitude à leur nouvelle condition d'hébergement avant de commencer l'étude.

Le protocole expérimental prend en compte l'impact potentiel sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier l'arrêt de l'expérience en cours. Si une souris présente des signes traduisant l'apparition de mal être, la souris va être immédiatement euthanasiée.

6465. Selon l'OMS pas moins de 15 millions de décès sont dus au cancer dans le monde chaque année soit presque 1 décès toutes les 2 secondes. Bien qu'il y ait eu de grands progrès dans la mise au point de médicaments contre le cancer la recherche pour la mise au point de médicaments plus performants permettant de prolonger la durée de vie des patients atteints de cancer reste plus que jamais une urgence.

L'objectif de notre projet est d'évaluer l'activité anti-tumorale de produits pharmacologiques chez la souris.

Les molécules pharmacologiques étudiées auront été sélectionnées pour leurs propriétés anti-tumorales vis-à-vis des tumeurs dans des tests cellulaires adaptés.

Adéquation avec la règle des 3R :

Remplacer

Dans un premier temps, les différentes molécules candidates sont testées *in vitro* sur les cellules cancéreuses. Cette étape permet d'éliminer les composés inactifs pour inhiber la prolifération des cellules cancéreuses. Ensuite les molécules actives *in vitro* vont subir une série de tests *in vitro* pour mettre en évidence leur absence de toxicité. Ainsi seules les molécules montrant une efficacité et une innocuité *in vitro* seront évaluées *in vivo*.

On ne peut pour l'instant pas remplacer cette étape étant donné qu'il est impossible de restituer actuellement la complexité du vivant dans les modèles *in vitro*.

#### Réduire

En accord avec les publications scientifiques et selon des contraintes statistiques nous réalisons notre étude avec des groupes de 8 souris.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 10 candidats médicaments par an à 3 doses. En incluant dans l'étude un groupe contrôle traité par le solvant seul. Ainsi qu'un groupe contrôle positif (médicament de référence approuvé dans l'indication étudiée). Selon le schéma suivant :

- 8 souris contrôle (solvant)
- 8 souris composé à dose faible
- 8 souris composé à dose intermédiaire
- 8 souris composé à dose forte
- 8 souris composé de référence (contrôle positif)

Par conséquent 400 souris par an est nécessaire.

Ce qui correspond à 2000 souris pour une période de 5 ans.

#### Raffiner

Seules les molécules présentant le meilleur rapport efficacité/innocuité *in vitro* seront étudiées *in vivo*.

Avant de démarrer le protocole *in vivo* nous faisons une série de vérifications pour s'assurer que le produit administré présente le profil réglementaire (choix de solvant, pH) pour être administré à l'animal par voie orale. De plus, seuls les composés, biodisponible, vont faire l'objet d'une étude d'efficacité.

Nous faisons également une étude préalable, pour déterminer les doses administrées ne présentant aucun effet indésirable pour l'animale pendant l'étude.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier d'état général des animaux. Et une mesure du poids de l'animal une fois par semaine.

6466. Ce projet d'une durée de cinq ans consiste à explorer en IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) les conséquences neurologiques d'un traumatisme crânien (TC) sévère chez le rat. Le TC est la première cause de handicap chez les moins de 40 ans et l'étude de ses conséquences comportementales et neurologiques est une priorité. Si plusieurs modèles de TC léger et modéré sont disponibles actuellement, l'étude du TC sévère est encore peu développée. Un TC sévère chez l'homme correspond à un choc important qui provoque un arrêt respiratoire, une perte de conscience de plus de trente minutes et souvent, des déficits neurologiques de long terme. Il existe peu de modèles animaux permettant de reproduire cette pathologie et de comprendre les mécanismes neurobiologiques responsables des lésions et des déficits observés chez les patients. La recherche clinique est difficile car chaque traumatisme est un cas particulier de par le site d'impact, la présence de complications comme l'hémorragie méningée, l'œdème cérébral, les défaillances cardiaques ou respiratoires etc.

Notre équipe a récemment mis au point un modèle TC sévère chez le rat qui consiste à appliquer une onde de choc sur la surface du cerveau après avoir pratiqué une petite ouverture d'environ 5 mm dans l'os du crâne. Comme en clinique, ce choc provoque un arrêt respiratoire qui nécessite une ventilation mécanique et une perte de conscience de plus de 30 min. En appliquant l'onde de choc de la même manière chez tous les animaux, il est possible d'obtenir des lésions neurologiques très reproductibles, ce qui est un atout inestimable pour la recherche. Immédiatement après le trauma, les animaux présentent des troubles locomoteurs du côté controlatéral au choc ainsi qu'une somnolence/apathie, mais ces symptômes tendent à régresser au cours des premiers jours. Ce projet visera dans un premier temps à raffiner ce modèle en introduisant un appareillage moins encombrant pour faciliter la mise en œuvre du TC sur plusieurs sites expérimentaux comme les plates-formes d'imagerie ou de comportement. Plusieurs zones d'application de l'onde de choc seront aussi étudiées afin d'optimiser la mise en évidence des déficits neurologiques par des tests simples du comportement locomoteur et de la performance sensorimotrice. Dans un deuxième temps, nous effectuerons un suivi longitudinal des animaux pendant deux mois après le TC sévère. Les animaux seront testés en IRM afin de mettre en évidence les zones de lésions cérébrales, la perfusion cérébrale et les dysfonctionnements de la barrière hématoencéphalique. Ils seront également testés pour leurs performances locomotrices et sensorimotrices afin d'objectiver leur récupération au cours du temps. Les animaux seront euthanasiés au terme de deux mois de suivi longitudinal.

Remplacement des animaux : l'utilisation de cultures cellulaires ou d'explants n'est pas informative car elle ne permet pas de reproduire les interactions complexes entre le cerveau, les vaisseaux sanguins, le système immunitaire et les organes périphériques. Il y a donc un besoin de modèles animaux permettant de reproduire cette pathologie et de tester de nouveaux médicaments susceptibles d'améliorer la récupération des patients.

Réduction du nombre d'animaux : ce projet impliquera 50 rats adultes mâles et femelles. Le nombre d'animaux utilisés au cours du projet est maintenu à un niveau minimal permettant des analyses statistiques nécessaires à l'établissement de conclusions fiables. De plus, nous utiliserons l'IRM qui permet un suivi longitudinal non invasif ne conduisant pas à l'euthanasie de l'animal à chaque point de mesure.

Raffinement du protocole expérimental: les animaux soumis au protocole de TC sévère sont traités contre la douleur avec des analgésiques puissants comme la buprénorphine, lidocaïne et ropivacaïne. Ces traitements sont maintenus pendant 48 h après le TC. Ensuite, les animaux ne montrent pas de signes de souffrance particuliers : ils sont capables de se nourrir de façon autonome et de

reprendre leur comportement de toilette. Ils ne sont pas agressifs envers les expérimentateurs, ce qui révèle une absence de souffrance sévère. Tout au long du projet, les animaux seront hébergés dans des cages enrichies (bâton à ronger, tunnel, igloo).

Mots clés : biocapteurs implantables, neuro-monitoring, agression cérébrale aiguë, analyse milieu interstitiel.

6467. La maladie des griffes du chat est une des maladies humaines d'origine animale les plus fréquentes en milieu urbain. Elle est due aux bactéries *Bartonellahenselae* et *Bartonellaclarridgeiae* dont le chat est le réservoir. Les bovins sont aussi réservoir d'autres espèces de bartonella (*B. bovis* et *B. chomelii*). Bien que réservoir de leur bartonelles, ces deux espèces animales peuvent aussi présenter des maladies consécutives au portage. Les souches de *B. henselae* sont subdivisées en deux groupes : les souches du groupe A ne sont pas ou peu retrouvées chez l'homme, les souches du groupe B le sont. Les souches de *B. bovis* dominent en Europe du Nord, les souches de *B. chomelii* sont plus fréquentes en Europe du sud.

Le but général de ce travail est d'isoler, identifier et étudier les souches hébergées par le chat et les bovins. Plus précisément, pour les souches félines, le travail portera sur l'identification de souches transmissibles à l'homme et leurs caractéristiques génomiques afin de mettre en évidence un ou des gènes impliqués dans cette transmission et à terme de réaliser un vaccin. Pour les souches bovines, le travail portera sur la répartition des deux espèces de bactéries en fonction de différents critères, dont le mode de transmission.

Cette étude nécessite de mettre en culture sur géloses enrichies au sang frais de lapin stérile des prélèvements sanguins des chats et des bovins. Le sang destiné à la fabrication des géloses sera prélevé sur des lapins dont le nombre d'animaux sera limité au strict nécessaire (n=15). Les prélèvements de sang seront réalisés sur les lapins sous anesthésie générale à tour de rôle durant toute l'étude et selon un intervalle d'au moins 2 semaines pour chacun d'entre eux. Les lapins seront suivis cliniquement durant toute la durée de l'étude et particulièrement après chaque prélèvement de sang dont le volume sera défini par le poids de l'animal avant chaque prélèvement. Les animaux seront hébergés dans des cages munies de plateforme avec un enrichissement du milieu de vie. Quand cela est possible les animaux disposent soit d'un espace de 2 cages ouvertes entre elles pour un meilleur confort, ou sont soit hébergés à deux dans 2 cages ouvertes entre elles. A la fin de l'étude, les animaux seront mis à l'adoption dès que cela est possible.

6468. L'encadrement et la pratique de l'expérimentation animale sont soumis à l'obtention d'une habilitation délivrée après le suivi de formations réglementaires. Selon le degré d'implication dans cette pratique: conception des projets ou simple pratique supervisée, la formation initiale est adaptée en contenu et en volume horaire. Contenu et volume horaire étant fixés réglementairement. D'une façon générale, ces formations sont constituées d'un module de base intégrant des enseignements généralistes liés notamment à la réglementation et à l'éthique, et d'un module complémentaire spécifique incluant les informations de base nécessaires au travail avec une espèce particulière (anatomie, physiologie, comportement, type de modèle expérimental...). Parmi ces informations, l'on trouve généralement les principales procédures de zootechnie appliquées à l'espèce, comme par exemple les méthodes de préhension et de contention, ou les méthodes et voies d'administration d'une substance. Si dans les formations complémentaires s'intéressant aux primates, aux animaux de rente ou aux animaux familiers qui constituent une faible part des espèces utilisées en recherche expérimentale, il est peu pertinent et éthiquement peu acceptable de mettre en œuvre des enseignements pratiques, ces derniers se conçoivent avec les rongeurs classiques (souris et rats) qui constituent plus de 70% des animaux expérimentaux. Qu'ils soient en effet techniciens ou chercheurs, la majorité des personnes pratiquant l'expérimentation est un jour confrontée au travail avec les rongeurs, ne serait-ce par exemple que dans les protocoles précocement élaborés dans un programme de recherche, visant l'établissement d'une preuve de concept.

Par ailleurs, une vidéo de démonstration est suffisamment parlante pour illustrer le travail avec les primates, les animaux de rente ou les animaux familiers, d'autant que ce travail est toujours encadré *in situ* avec et/ou par des personnels très qualifiés. Ce n'est pas forcément le cas avec les rongeurs dont l'abord nécessite un entraînement individuel aux procédures de bases standardisées.

Cette demande concerne donc la mise en place de travaux pratiques (TP) avec des rats et des souris dans le cadre de deux formations réglementaires à l'intention de personnes qui sont amenées, dans le cadre de leur profession, à travailler avec ces espèces: une formation de 'Praticien' destinée aux personnes appliquant des procédures expérimentales, et une formation de 'Concepteur' destinée aux personnes concevant et appliquant des procédures expérimentales. Les animaux sont inclus dans deux types de TP: l'un visant à enseigner les méthodes de préhension, de contention, de prélèvement ou d'administration de substances (TP 'Procédures de base'); l'autre visant à démontrer les effets comportementaux de l'isolement et/ou de l'enrichissement du milieu de vie des animaux (TP 'Enrichissement').

Remplacer: l'apprentissage de la zootechnie de base des rats et des souris qui sont de petits animaux, nécessite un entraînement pratique à des procédures standardisées qu'il est difficile d'appréhender sans une confrontation au réel.

Réduire: Dans la mesure du possible, les rats et souris impliqués dans les TP sont des animaux 'réutilisés' issus: soit de projets de recherche incluant des procédures non invasives (imagerie) et/ou légères et non terminales, soit d'autres protocoles d'enseignement, développés à l'Université. Leur nombre est réduit au minimum et est fonction lors de chaque séance du nombre de stagiaires inscrits. Dans la mesure du possible également, ces TP regroupent les stagiaires suivant les deux types de formations : les personnes concevant et les personnes appliquant des procédures expérimentales - Ceci afin d'éviter de multiplier les séances intégrant de trop petits nombres de participants et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaire par an.

Nombre d'animaux par séance pour un maximum de 24 stagiaires:

- TP 'Procédures de base': 16 souris et 16 rats ;

- TP 'Enrichissement': 24 souris. Soit 40 souris et 16 rats.

Nombre d'animaux pour un maximum de deux formations 'Concepteur' et d'une formation 'Praticien' par an, et dans le cas où les TP ne sont pas regroupés pour 2 formations car le nombre de stagiaires inscrits est maximum: 120 souris et 48 rats (Ci-dessus fois 3)

Nombre maximum d'animaux pour 5 années: 600 souris et 144 rats (Ci-dessus fois 5). Ce nombre constitue le nombre maximal d'animaux dans le cas où les deux conditions suivantes sont réunies: 1) 3 formations distinctes par an tous les ans et 2) 24 stagiaires dans chacune des trois formations tous les ans.

Raffiner: Les animaux sont inclus uniquement dans des TP dont les procédures sont classées légères; et dans des TP non invasifs visant à démontrer les effets comportementaux de différentes conditions d'hébergement. Les enseignements pratiques sont réalisés sous l'égide de personnels formés et compétents, pratiquant en routine des procédures expérimentales, à raison d'un encadrant pour 3 stagiaires. Hors protocoles expérimentaux, les animaux sont hébergés dans des conditions visant à favoriser l'expression de leurs comportements spécifiques: hébergements en groupes sociaux, enrichissement du milieu de vie.

6469. Ce projet a pour objectif la création, l'hébergement et/ou le maintien de lignées de rongeurs génétiquement modifiés pour le compte de la communauté scientifique. Les animaux génétiquement modifiés sont utilisés comme modèle expérimental pour la recherche ou pour le développement de médicaments.

Ce projet consiste en plusieurs procédures sur souris ou rats, qui peuvent être, ou non, associées :

- Création de nouvelles lignées transgéniques,
- Réception et/ou production d'animaux transgéniques à phénotype dommageable, élevage et sélection,
- Transfert d'embryons,
- Cryoconservation de lignées transgéniques.
- Prise de sang pour caractérisation de lignées transgéniques.

Aucune méthode alternative ne peut remplacer ce projet qui vise à fournir aux scientifiques les animaux qui leur permettront d'étudier dans des organismes entiers et vivants toutes les conséquences d'une altération génétique définie et/ou l'intérêt de molécules thérapeutiques pour lutter contre ces conséquences. L'intérêt de disposer d'organismes vivants et entiers est de pouvoir observer ceci dans l'ensemble des organes, tissus et fonctions physiologiques.

Basé sur l'activité précédente, nous estimons utiliser par an :

- Réception d'au maximum 750 rongeurs (= fondateurs envoyés par la communauté scientifique) avec phénotype dommageable.
- Naissance d'au maximum 5000 rongeurs avec phénotype dommageable
- 7 500 femelles superovulées (= donneuses d'embryons) dont la moitié environ aura un phénotype dommageable
- 250 mâles vasectomisés au maximum
- 1 500 femelles receveuses d'embryons au maximum
- 200 animaux issus de lignées transgéniques sans phénotype dommageable, subissant un (ou des) prélèvement(s) de sang.

Soit au total 15 200 rongeurs par an soit 76 000 rongeurs au maximum pour les 5 ans du projet (avec une répartition de 90% souris / 10% rats)

Pour chaque procédure, le nombre d'animaux utilisés et produits est défini en fonction des besoins des scientifiques et dans le respect du principe de réduction du nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs ces rongeurs sont hébergés conformément à leurs besoins (groupes sociaux, enrichissement, température/hygrométrie adaptées...) et font l'objet d'une observation quotidienne. Tous les gestes techniques le nécessitant (ex : chirurgie de transfert d'embryon) sont réalisés après anesthésie et/ou administration d'un antidouleur. Parmi les rongeurs transgéniques élevés/maintenus, certains peuvent présenter, du fait de leur modification génétique, une pathologie ou une sensibilité particulière pouvant induire un stress, une douleur ou une souffrance. Ces animaux sont clairement identifiés et font l'objet d'une attention particulière et, le cas échéant de soins appropriés (ex : soins locaux, alimentation spécifique, enrichissement de l'environnement, traitement médical approprié ...). Des points limites sont également définis pour chaque procédure afin d'éviter toute souffrance.

6470. Les artères de résistance sont les petits vaisseaux sanguins situés en amont des capillaires. Ils sont cruciaux pour la perfusion sanguine des organes vitaux avec un contrôle fin du débit et de la pression. Des perturbations de la structure ou de la fonction des artères de résistance peuvent entraîner une augmentation de la pression capillaire et rapidement endommager l'organe perfusé, comme cela se produit dans le diabète, les maladies cardio- et cérébro-vasculaires ou la maladie rénale chronique. Les artères de résistance ont un tonus de base permettant un contrôle du débit sanguin local. Ce tonus de base résulte de l'interaction entre la contraction myogénique des cellules musculaires lisses dépendant de la pression et la dilatation induite par le flux (dilatation flux-dépendante, DFD) résultant de l'activation des cellules endothéliales par la contrainte de cisaillement. La DFD est largement utilisée dans la pratique clinique et une réduction de DFD est la caractéristique précoce d'un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. La DFD est réduite lors du vieillissement et par les troubles cardio-vasculaires et métaboliques notamment. Néanmoins, l'identité de la structure sensible au cisaillement, ainsi que les voies de transduction associées, restent mal connues. Il a récemment été montré que Piezo1, un canal cationique mécanosensible, peut être activé par des forces mécaniques, dont la contrainte de cisaillement. La suppression de Piezo1 induit une létalité embryonnaire associée à des défauts majeurs de la structure du système cardiovasculaire. L'activation de Piezo1 au niveau endothélial par le flux sanguin est impliquée dans la vasculogénèse. Cependant, le rôle physiologique de Piezo1 dans la circulation de l'adulte n'a pas encore été étudié, en particulier dans la circulation de résistance. L'équilibre entre demande métabolique et réponse des artères de résistance est fortement modifié en situation pathologique. Nous émettons l'hypothèse que l'activation de Piezo1 dans les cellules endothéliales est impliquée dans la DFD. Nous allons tout d'abord déterminer la distribution vasculaire de Piezo1 en utilisant une souris reportrice Piezo1/LacZ. Dans un second temps, en utilisant une délétion endothélium-spécifique et conditionnelle de Piezo1, nous étudierons le rôle de ce canal ionique mécano-sensible dans la DFD des artères de résistance. Dans une étape ultérieure, nous identifierons dans l'endothélium les voies de transduction moléculaire activées par Piezo1. Enfin, nous étudierons les conséquences de la délétion de Piezo1 sur la dysfonction vasculaire associée au diabète. Ce projet nécessitera l'utilisation de 1800 animaux au maximum. Nous réduirons ce nombre au maximum, si des techniques de remplacements sont possibles nous les adopterons, nous utiliserons au maximum chaque animal en prélevant les

organes des animaux euthanasiés en vue des analyses *ex vivo* afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Les analyses statistiques utilisées seront des analyses groupées par Anova deux voies post test Bonferroni en mesures cumulées pour les expérimentations *in vivo* et des t tests. D'après notre expérience dans des modèles animaux afin de permettre la significativité des résultats l'inclusion de 20 souris par groupe devrait être suffisante. Nous estimons que ce chiffre est un minimum du fait de la taille des artères. La précision et la complexité des techniques mises en œuvre par la suite peuvent aussi induire une variabilité importante. Si une très franche tendance se dégageait avec 20 souris mais que le seuil de significativité n'était pas atteint, nous souhaiterions augmenter le nombre d'animaux à un maximum de 25 par groupe.

En accord avec la règle des 3 R, et dans le but d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons le moins de souris possible.

Nous appliquons la règle des 3 R:

**REMPLETER** Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle *in vitro*, car le remodelage vasculaire met en jeu le système immunitaire et hormonal.

**REDUIRE** Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Nous utiliserons le test de Student.

**RAFFINER** Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux).

Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine.

Ces études apporteront de nouvelles connaissances sur les mécanismes moléculaires de détection des forces de cisaillement dans les artères de petit diamètre en conditions physiologiques et pathologiques. Nous déterminerons ainsi la place potentielle d'une modulation pharmacologique de Piezo1 afin de corriger la dysfonction artérielle et les perturbations des débits sanguins locaux.

6471. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales ayant une incidence de 4 à 5 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes. Il s'agit également du deuxième type de cancer le plus fréquent chez l'enfant. Les patients atteints de glioblastome, le plus agressif des gliomes, survivent en moyenne 14 mois après le diagnostic de la tumeur et ce malgré le traitement combinant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie. C'est pourquoi il est nécessaire de chercher de nouveaux traitements. Notre projet s'inscrit dans ce contexte en utilisant une source de rayons X très particulière et encore expérimentale, de basse énergie mais de haut flux, permettant (i) de sélectionner au mieux les énergies intéressantes, et (ii) de faire un microfractionnement spatial de la dose. Ces deux spécificités ne sont pas techniquement possibles sur les sources classiques hospitalières à l'heure actuelle. Nous explorons le potentiel de cette technique depuis une quinzaine d'années déjà, selon différentes approches : simulation Monte Carlo, dosimétrie expérimentale, irradiation de cellules en culture (sans utilisation d'animaux vivants). Ces approches bien qu'indispensables restent très limitées car elles ne prennent pas en compte la complexité du tissu tumoral, se développant de façon autonome, possédant sa propre vascularisation, etc... De fait, l'utilisation de modèles précliniques porcins permet de tester les modalités d'imagerie (diagnostique), les modalités d'irradiation (géométrie, balistique, dose) et les protocoles de thérapie visant à augmenter la sécurité du patient relativement à la dose délivrée (adjonction de médicaments anticancéreux) sur des tumeurs proches des tumeurs humaines.

Une des étapes indispensables pour la mise en place d'un nouveau protocole de radiothérapie est l'étude de la toxicité du traitement et ce projet permettra de tester la neurotoxicité à long terme de notre méthode sur le tissu cérébral sain. Ce projet est en parfait respect de la règle des 3R: remplacement, réduction, raffinement. Ce projet portant sur la physiologie cérébrale, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Pour cette demande (n total=10 animaux), nous avons estimé une utilisation d'animaux à hauteur de 2 animaux pour la mise au point de l'imagerie cérébrale par IRM et de 4 par groupe expérimental (irradiés ou non). Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à la littérature, aux expériences réalisées ces 15 dernières années qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Par ailleurs, certains protocoles de notre équipe font déjà l'objet d'essais cliniques humains (patients volontaires souffrant de tumeurs cérébrales). L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance, par des mesures antalgiques appropriées.

6472. Le virus Zika est un virus proche de ceux de la fièvre jaune et de la Dengue, transmis par des moustiques. Identifié en 1948 en Ouganda, il a été responsable d'une épidémie en 2007 dans le Sud-Est du Pacifique puis en 2013-2014 en Polynésie Française. Il vient récemment de se répandre dans une vingtaine de pays du continent Américain. Cette infection, qui se traduit par un syndrome grippal modéré (voire une absence totale de symptômes chez de nombreuses personnes infectées) est donc une maladie émergente épidémique. L'une de ses conséquences les plus alarmantes est une association probable avec des malformations congénitales (en particulier microcéphalies) observées chez les bébés de femmes infectées.

En raison de la répartition géographique en forte expansion du virus Zika et de la présence des moustiques vecteurs dans de nombreux pays, le développement de programmes de recherches visant à comprendre la pathogénie de l'infection et la mise au point de modalités préventives et thérapeutiques est devenu une priorité.

En complément des études réalisés chez l'homme sur le terrain et au laboratoire sur des cultures de cellules, il est indispensable, pour étudier certains aspects de la pathogénie du virus et tester de nouvelles approches thérapeutiques ou vaccinales, de disposer d'un modèle animal de petite taille qui actuellement fait défaut.

Ce projet a pour objectif de développer un modèle d'infection par le virus Zika chez la souris. Dans un premier temps, nous testerons plusieurs souches virales et une diversité de lignées de souris pour identifier la meilleure combinaison permettant la multiplication du virus chez la souris, comme cela est observé chez l'homme.

Une fois ces conditions expérimentales établies, nous testerons l'efficacité de molécules dont l'activité anti-virale a été préalablement démontrée sur des cultures cellulaires. Il s'agit d'un préalable indispensable à tout essai clinique chez l'homme.

Nous utiliserons également ce modèle pour étudier la transmission du virus entre des femelles gestantes et leurs fœtus et nous rechercherons d'éventuels retards de croissance ou malformations.

Enfin, nous étudierons si la composition génétique de la souris influence sa sensibilité à l'infection par le virus Zika ou la gravité de symptômes que le virus peut induire.

Les effectifs d'animaux seront ajustés en fonction des résultats obtenus. L'estimation présentée prend en compte le plus grand nombre de modalités expérimentales à tester. Ce nombre sera fortement réduit dès lors que quelques combinaisons favorables auront été identifiées. Sur les 5 années, ce projet aura recours au maximum à 5092 souris dans 4 procédures de sévérité modérée.

Les rares données de la littérature n'ont pas rapporté de signes cliniques détectables chez les souris adultes. Toutefois, notre objectif est de trouver une combinaison souche virale x lignée de souris développant des symptômes. Pour cette raison, tous les animaux infectés seront soigneusement suivis pour détecter précocement un impact sur le bien-être des animaux. Des points limites seront définis en fonction des symptômes qui seront observés. Au total, ce projet permettra de réaliser d'importants progrès dans notre connaissance et nos capacités de traitement de cette infection qui touche d'ores et déjà plusieurs millions d'individus.

6473. Les vascularites associées aux anticorps dirigés contre les globules blancs (dénommés ANCA pour anticorps antineutrophile cytoplasmique) constituent un groupe hétérogène de maladies rares caractérisées par une inflammation des vaisseaux. Leur pronostic est lié à l'atteinte des organes nobles avec notamment la survenue de saignements au niveau des poumons, entraînant la mort des patients dans 20% des cas où l'échec des traitements est courant.

Les ANCA sont capables d'activer les globules blancs, à l'origine d'une destruction de la paroi des vaisseaux. Par ailleurs, Les globules blancs activés ont la particularité d'expulser une partie de leur information génétique (appelée acide désoxyribonucléique (ADN)) et de leur contenu cellulaire hors de leur enveloppe, formant ainsi des structures aux allures de filet appelées NETs (Neutrophil Extracellular Traps). Récemment, l'implication des NETs a été mise en évidence dans l'apparition des ANCA, et dans les saignements intra-pulmonaires proches de ceux retrouvés dans les vascularites au cours du syndrome de détresse respiratoire post transfusionnel. Pour autant, ces mécanismes restent encore mal compris.

Nous proposons d'étudier l'implication des NETs à partir d'un nouveau modèle murin de vascularite. Ce modèle nous permettra de se focaliser sur les NETs et d'étudier leur implication dans l'apparition des ANCA et de la vascularite. Pour cela, nous utiliserons la molécule d'hème, connue pour induire la formation de NETs et libérées lors des saignements intra-pulmonaires, associée ou non à des substances permettant de créer un état pro-inflammatoire. La réalisation de prélèvements sanguin et de tissu permettra de suivre respectivement l'apparition des ANCA, et d'identifier les NETs. De plus nous testerons dans ce modèle murin de vascularites à ANCA un traitement par la désoxyribonucléase de type I, une molécule capable de dégrader les NETs. Afin de confirmer l'effet de la désoxyribonucléase de type I et d'élargir ses indications thérapeutiques, nous testerons également cette molécule dans un autre modèle d'hémorragie intra-alvéolaire validé dans la littérature induit par le pristane où nous aurons montré l'implication de la NETose. L'ensemble des procédures envisagées nécessitera au maximum un total de 1137 souris sur 5 ans. Au cours de nos expérimentations nous utiliserons le nombre d'animaux minimal, strictement suffisant et nécessaire pour mener à bien cette étude en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Les mesures de raffinement prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux comprendront un hébergement avec enrichissement et une évaluation clinique quotidienne avec une grille d'évaluation de la douleur permettant d'adapter au mieux la prescription d'anti-douleurs ou l'arrêt de la procédure expérimentale concernée.

6474. Ce projet a pour but de se former à la technique de mesure de la force musculaire *in situ* chez la souris. Cette technique est nécessaire à la réalisation d'autres projets, évalués par le comité d'éthique, qui visent à tester de nouveaux candidats médicament qui pourraient être utilisés pour soigner ou réduire de façon significative les symptômes de patients souffrants de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD). Ainsi le modèle animal ne peut pas être REMPLACÉ dans ce projet.

Ce protocole requiert la maîtrise d'une technique chirurgicale ainsi que celle de l'utilisation d'un équipement qui mesure la force musculaire. L'entraînement nécessite d'utiliser des animaux vivants anesthésiés afin de pouvoir mesurer la force musculaire. Des souris "sauvages" (c'est-à-dire non génétiquement modifiées) seront testées dans un premier temps afin d'atteindre une bonne compétence du protocole. Dans un deuxième temps, des souris mdx qui reproduisent certains éléments de la pathologie humaine seront utilisées pour ce projet afin de s'entraîner à détecter la diminution de la force musculaire chez des animaux malades.

Une deuxième partie du projet consistera à tester de nouveaux anesthésiques pour réaliser ce protocole; en effet, le pentobarbital utilisé pour cette technique n'est plus commercialisé en France. Il s'agit de trouver un anesthésique entraînant une sédation suffisamment profonde sans avoir d'impact sur la contractilité musculaire; 3 techniques alternatives seront testées. Une fois l'anesthésique sélectionné, les résultats de mesure de force musculaire obtenus avec celui-ci seront comparés avec ceux obtenus avec la méthode de référence (pentobarbital) sur des souris sauvages ainsi que sur des souris mdx afin de s'assurer de la répétabilité des résultats.

REDUCTION: Etant donné qu'il est nécessaire que 2 personnes du service soient entraînées à la technique, nous estimons le nombre de souris nécessaire pour la formation à 30 souris "sauvages" adultes et 20 souris mdx. La DMD affectant les garçons, nous utiliserons des souris mâles. Le nombre de souris pourra être diminué dans le cas où la technique serait bien maîtrisée après entraînement sur un nombre inférieur de souris. Cependant afin de réaliser efficacement les projets suivants, visant à tester de nouveaux médicaments sur cette pathologie, il est indispensable que la technique soit maîtrisée et que l'on ait réussi à détecter une anomalie de la force musculaire chez les souris mdx.

**RAFFINEMENT:** L'anesthésique utilisé couramment pour ce protocole, le pentobarbital, n'est plus produit en France. Nous allons donc être amenés à tester 3 autres protocoles d'anesthésie afin de le remplacer. Pour cela nous prévoyons dans un premier temps de tester chacun des 3 anesthésiques sur 3 souris sauvages et 3 souris mdx afin de sélectionner l'anesthésique qui apporte la meilleure sédation dans les conditions opératoires fixées par le protocole. L'anesthésique choisi sera ensuite testé sur 10 souris sauvages et 10 souris mdx afin de s'assurer que les mesures sont comparables avec celles obtenues pas anesthésie au Pentobarbital. Ainsi 38 souris supplémentaires seront utilisées pour établir le nouveau protocole anesthésique, ce qui fait un total de 88 souris au maximum pour ce projet.

6475. Au cours des dernières décennies, l'obésité est devenue une préoccupation majeure pour la santé et affecte des centaines de millions de personnes. L'augmentation de la prévalence de l'obésité est associée à une augmentation de la prévalence des troubles métaboliques liés à l'excès de poids corporel, en particulier le diabète de type 2. La thérapie primaire pour les patients obèses et diabétiques est d'induire une perte de poids qui entraîne une amélioration des paramètres glycémiques et de la sensibilité à l'insuline. Cependant, la plupart de ces patients ne parviennent pas à obtenir une perte de poids satisfaisante et un contrôle glycémique adéquat. En cas d'obésité morbide, des chirurgies bariatriques peuvent être proposées. Elles entraînent une perte de poids rapide grâce à une déviation du trajet des aliments et une réduction de l'estomac. La procédure de bypass gastrique Roux-en-Y (RYBPG) est l'une des chirurgies bariatriques les plus efficaces, incluant un réarrangement gastro-intestinal combiné à une restriction du volume de l'estomac. Elle induit une perte de poids substantielle et soutenue jusqu'à 30% et une satiété postprandiale améliorée, mais aussi une amélioration rapide du diabète, avant toute perte de poids. Cependant, les mécanismes sous-jacents des effets bénéfiques du RYBPG indépendants de la perte de poids restent peu connus.

Chez les rongeurs, différents modèles de chirurgie bariatrique ont été développés, avec comme handicap la difficulté de réaliser cette microchirurgie chez un petit animal comme la souris. Toutefois, les effets bénéfiques du by-pass gastrique ont été confirmés chez la souris. Au niveau moléculaire, les études chez la souris ont permis de mettre en évidence un rôle bénéfique d'une induction de la production de glucose par l'intestin lors du by-pass gastrique, pouvant expliquer la diminution de la prise alimentaire et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les modifications moléculaires impliquées dans les améliorations glycémiques et énergétiques des souris ayant subi un by-pass gastrique, en étudiant les effets du by-pass gastrique chez des souris transgéniques incapables de produire du glucose par l'intestin.

Ce projet sera réalisé dans le respect des 3R :

**Remplacement :** La régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique est déterminée par un dialogue constant entre le système nerveux central et les organes périphériques. L'étude des effets du by-pass gastrique nécessite de travailler chez l'animal pour mesurer les conséquences métaboliques sur différents tissus et fonctions périphériques, comme le tissu adipeux, la production de sels biliaires, la malabsorption des nutriments au niveau de l'intestin. Cette étude nécessitera de travailler chez la souris puisque nous analyserons les effets du by-pass chez des souris transgéniques incapables de produire du glucose par l'intestin.

**Réduction du nombre d'animaux :** Le nombre d'animaux sera réduit au minimum en prenant en compte la difficulté de réalisation de cette chirurgie chez la souris, qui peut entraîner une mortalité importante. Le taux de mortalité de cette chirurgie est aussi non négligeable chez l'homme, sans que le rapport bénéfice-risque soit remis en cause pour cette raison. Ce projet sera limité à l'utilisation de 120 souris transgéniques et 120 souris non transgéniques, soit au total 240 souris, sur une période de 5 ans.

**Raffinement :**

A noter que cette étude sera réalisée chez des souris obèses et diabétiques. L'élevage de ces souris se fera dans des conditions contrôlées avec une augmentation du nombre de change des animaux si la litière est souillée par un excès d'urine.

La chirurgie de type by-pass est une chirurgie compliquée à réaliser chez la souris (petit animal) et nécessite une expertise. Elle nécessite une prise en charge général de l'animal avant (période d'adaptation), pendant et après l'opération (au minimum 10 jours) pour limiter le stress et la douleur. Un mélange d'analgésiques et d'anti-inflammatoires sera injecté à la souris juste avant l'anesthésie et pendant les 5 jours suivant la chirurgie. Un analgésique local sera appliqué avant l'ouverture de l'abdomen ainsi qu'au moment de la suture de la paroi abdominale. La chirurgie sera réalisée dans des conditions d'asepsie contrôlées pour limiter toute infection. Lors de l'intervention et à son réveil, la température de l'animal sera maintenue à 37°C. La reprise de l'alimentation sera, comme chez l'homme, très progressive et contrôlée pour limiter tout risque de fissure gastrique ou toute occlusion. L'apport d'énergie sera réalisé par une injection de glucose les deux premiers jours et un contrôle de la glycémie, avant introduction de petites quantités de nourriture riche en énergie. Une grille de suivi du comportement de l'animal (mobilité, toilette) et de ses paramètres physiologiques (respiration, présence de fèces, température, prises alimentaire et hydrique) permettra de repérer tout signe de souffrance ou mal-être. L'atteinte d'un point limite, qui a été calculé en connaissance des conséquences de cette chirurgie (obstruction gastrique, fissures intestinales), entraînera l'euthanasie de l'animal selon les méthodes autorisées par la législation. Après une période de repos post-opératoire, les paramètres métaboliques des souris seront étudiés. Tous les animaux du projet seront euthanasiés pour réaliser une analyse moléculaire des tissus.

En conclusion, ce projet devrait permettre de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets bénéfiques de la chirurgie bariatrique et évaluer le rôle de l'induction de la production de glucose par l'intestin dans ces effets.

6476. La dermatite atopique, aussi appelée eczéma atopique, est une maladie chronique inflammatoire de la peau. Elle se développe préférentiellement chez le nourrisson et l'enfant, mais peut persister voire apparaître parfois chez l'adolescent et l'adulte. Elle est caractérisée par une sécheresse cutanée associée à des lésions de type eczéma (rougeurs et démangeaisons, vésicules, suintement et croûtes) qui évoluent par poussées. L'incidence de cette maladie est estimée entre 6 et 16% en fonction des études. Le présent projet

visé à développer et utiliser un modèle de dermatite atopique induit chez la souris dans le but d'évaluer l'activité de candidats médicaments dans cette indication.

Les procédures expérimentales décrites dans ce projet consistent à développer et optimiser le modèle expérimental de façon à ce que les lésions induites chez l'animal soient très comparables à celles observées chez l'homme pour ensuite tester l'efficacité de nouvelles molécules en les comparant à des produits de référence. Les critères d'évaluation relevés sont d'ordre clinique (score des lésions cutanées, comptage des épisodes de grattage), physiopathologiques (pertes en eau au niveau cutané), biologiques (marqueurs de l'inflammation) ou histologiques (modifications structurelles de la peau). Les candidats médicament testés sont appliqués le plus souvent par voie locale, directement sur les lésions cutanées. Ils peuvent également être administrés par voie orale ou parentérale (sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, ...) en fonction de leur mode d'action.

Le bénéfice attendu de ce projet est très important car il permet de démontrer au travers d'un modèle expérimental prédictif chez la souris, l'activité de futurs médicaments dans la dermatite atopique. Ainsi, seules les molécules les plus efficaces poursuivent les étapes de développement. Les informations générées, associées aux données de toxicologie des molécules testées, contribuent également à déterminer les premières doses à administrer chez l'homme. Les procédures expérimentales mises en œuvre concernent un nombre limité d'animaux et interviennent après une sélection des molécules d'intérêt sur des modèles *in vitro*, par exemple leur potentiel ou non à traverser la barrière cutanée.

Remplacer ce modèle expérimental par des tests *in vitro* n'est pas possible car l'ensemble des interactions anatomiques et fonctionnelles d'un organisme vivant sont nécessaires pour évaluer l'efficacité d'une molécule active sur des lésions cutanées de dermatite atopique.

La réduction du nombre d'animaux nécessaires s'opère au travers :

- d'une randomisation soignée des souris après induction qui permet d'objectiver plus facilement des différences significatives sur un nombre limité de sujets,
- de l'utilisation de ce modèle seulement pour les molécules les plus prometteuses, sélectionnées au préalable à partir de tests *in vitro*.

Un effectif maximal de 3240 souris sur 5 ans est nécessaire pour la conduite de ce projet.

Le raffinement des procédures expérimentales se traduit par une anesthésie des animaux lors de l'application de l'agent d'induction et potentiellement des traitements, la mise à disposition d'enrichissements dans les cages (exemple : igloo, matériel de nidification, bâtonnet à ronger) et une surveillance clinique particulière pendant toute la durée de l'étude.

6477. L'hypertrophie ventriculaire gauche survient chez des patients présentant une hypertension artérielle ou une maladie valvulaire cardiaque telle que le rétrécissement aortique. Non- ou insuffisamment traitée elle s'accompagnerait de complications graves comme arythmie ventriculaire, insuffisance cardiaque et mort subite. Très peu de traitements sont actuellement disponibles; la plupart vise à diminuer la pression artérielle, mais aucun ne permet de remédier efficacement à l'hypertrophie ventriculaire elle-même.

Notre hypothèse implique la compréhension de la pathologie dans ses débuts, notamment dans la phase inflammatoire quand l'hypertrophie pourrait potentiellement être réversible. Dans une étude précédente nous avons analysé l'expression de l'ensemble des chimiokines (petites protéines chimioattractantes) et leurs récepteurs dans le ventricule gauche du cœur hypertrophié après constriction de l'aorte chez le rat. Parmi les chimiokines/récepteurs les plus surexprimés chez les rats hypertrophiés, CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 ont été observés, responsables du recrutement de cellules inflammatoires telles que macrophages et lymphocytes. Par ailleurs, CCL2 et CX3CL1 sont surexprimés dans le sérum et le tissu cardiaque de patients en insuffisance cardiaque. Une inhibition de l'action de ces deux chimiokines pourrait potentiellement atténuer le développement de l'hypertrophie cardiaque.

Pour répondre à cette hypothèse, nous avons établi un protocole en utilisant des souris déficientes des récepteurs de CCL2 et CX3CL1 d'un part, et des composés commerciaux comme traitement pharmacologique, d'autre part, dans le modèle de constriction de l'aorte chez la souris.

Aucune méthode alternative (p. ex. cellulaire) ne permet de reproduire le développement de l'hypertrophie cardiaque ; les résultats scientifiques attendus nécessitent ce modèle animal.

490 souris au total seront utilisées dans cette étude avec n=8 souris dans les groupes de constriction de l'aorte et n=6 souris dans les groupes d'opération factice en cinétique à J3, J7, J14, J21 et J28:

-210 souris pour l'étude avec traitement par les composés à des doses déjà utilisées *in vivo*

-280 souris pour l'étude utilisant de souris génétiquement modifiées, viables fertiles et ne montrant aucune anomalie physique ou de comportement :

- 70 souris déficientes de CCR2 et 70 souris contrôles avec génotype sauvage
- 70 souris déficientes de CX3CR1 et 70 souris contrôles avec génotype sauvage

Le nombre minimum d'animaux par groupe (n=8 souris/groupe pour les constriction de l'aorte et n=6 souris/groupe pour les opérations factices) a été déterminé d'après notre expérience et les données de la littérature sur cette technique, de manière à obtenir une analyse statistique correcte des résultats.

Notre objectif est d'étudier l'effet de l'inactivation des récepteurs sur:

- le recrutement de cellules inflammatoires dans le tissu cardiaque dans la phase initiale inflammatoire,
- la progression de l'hypertrophie cardiaque à dans la phase tardive de l'hypertrophie.

Ces résultats nous permettront éventuellement de définir ces chimiokines et leurs récepteurs comme potentielles cibles thérapeutiques dans un stade initial du développement de l'hypertrophie du ventricule gauche, qui serait une stratégie thérapeutique innovante dans cette pathologie.



Le bien-être des animaux sera assuré en respectant la surface des cages et en enrichissant le milieu par des tubes en carton. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'opération pour évaluer tout signe de souffrance : en cas de baisse du poids, de modification de l'apparence (les yeux mi-clos, le poil hérissé, le dos courbé, l'animal prostré), ou de problème post-chirurgical (saignement, ouverture de la cicatrice, infection cutanée), les animaux seront euthanasiés par administration intrapéritonéale d'une solution d'anesthésiques en surdose. Des anesthésiques (kétamine et xylazine) à effet analgésique seront utilisés pendant l'opération. La douleur post-opératoire sera prise en charge par l'administration de l'analgésique buprénorphine par voie intrapéritonéale.

6478. La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie (animale telles qu'un être humain, végétale, fongique, bactérienne), qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties (foie, rein, poumon... chez l'animal).

La peau est une porte d'entrée pour des agents toxiques. La couche superficielle de la peau ou couche cornée fonctionne comme une barrière mais lorsqu'un produit franchit cette barrière, il diffuse ensuite à travers les autres couches plus profondes de la peau, l'épiderme, le derme et l'hypoderme. La diffusion passive du produit à travers la peau dépend de la surface d'application, de la concentration et des caractères physico-chimiques des produits. L'élimination du produit de la peau se fait par passage dans la circulation sanguine principalement au niveau du derme. Chez le nourrisson, l'absorption est plus importante car la couche cornée est plus mince. Chez l'enfant, le risque d'intoxication est accru car le rapport surface/poids est augmenté par rapport à l'adulte. Des irritations, de l'urticaire, de l'eczéma, des allergies peuvent être observées lors de l'exposition à des toxiques et des effets toxiques neurologiques ou digestifs sont également possibles en fonction de la dose utilisée.

La toxicité dermique aiguë est l'effet néfaste qui se produit dans un court laps de temps et qui résulte de l'administration par application sur la peau d'une dose forte d'une substance au cours d'une période de 24 heures. La dose est la quantité administrée de la substance à tester. Elle s'exprime en poids de substance testée par unité. Une seule dose est utilisée et on analyse les signes de toxicité et la mortalité. Une étude de toxicité dermique aboutit classiquement à la détermination de la dose maximale tolérée (DMT). La DMT dermique est la valeur statistiquement dérivée d'une dose unique de substance dont l'administration par voie cutanée peut provoquer la mort de 50 % des animaux d'expérience. C'est une technique exploratoire, permettant de "trier" les produits les plus toxiques et l'on considère qu'au-dessus de 2 g/kg de poids corporel, la DMT n'a plus de signification.

L'objet de ce projet d'une durée de 5 ans, réalisé selon les exigences de la ligne directrice OCDE n° 402 ("Acute Dermal Toxicity" - projet final d'août 2016) est donc d'étudier la toxicité éventuelle de 50 composés, administrés par application cutanée en traitement unique à une dose de départ de 50, 200, 1000 ou 2000 mg/kg en fonction des informations disponibles sur les produits à tester et notamment des études préalables effectuées sur des cellules (dose de 200 mg/kg si aucune information connue sur le composé à tester). Ces études de toxicité aiguë ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives. Elles sont effectuées préalablement à la réalisation d'études de toxicité dermique sub-chronique pendant 21 à 28 jours et/ou chronique pendant 90 jours.

L'enjeu social est donc de prouver l'absence éventuelle de toxicité de ces 50 composés pour une utilisation future chez l'homme. Pour l'ensemble de ce projet sur une période de 5 ans, le minimum d'animaux nécessaires est utilisé (réduction) : 150 rats au minimum et 600 rats au maximum de 200 à 300g. Les animaux sont hébergés par 3 dans des cages transparentes (48x27x20 cm) jusqu'au jour de traitement à la suite de quoi ils sont placés en cage individuelle pour éviter qu'ils ne se retirent mutuellement le pansement. Ils disposent chacun d'une brique de bois comme enrichissement.

Ces études sont réalisées chez des rats femelles uniquement, celles-ci étant considérées comme plus sensibles que les mâles aux effets toxiques potentiels de substances. Les animaux seront traités par une application cutanée unique de produit à tester après rasage du dos. Une observation de la peau 24 heures après traitement permettra de déceler tout signe d'effet toxique. En fonction de la dose de départ utilisée et des résultats observés, des doses plus ou moins élevées sont testées sur des groupes de 3 animaux afin de déterminer la DMT de chacun de ces 50 composés.

Étant donné qu'il s'agit d'études de toxicité, aucune médication ne peut être donnée aux animaux pour soulager leur souffrance éventuelle. Par contre l'atteinte de points limites définis entraînera l'euthanasie en conformité avec les recommandations éthiques. Les animaux sont observés et pesés régulièrement au cours de l'expérimentation, week-end et jours fériés compris, afin de détecter tout comportement anormal ou atteinte de point limite.

6479. Objectif du projet: Évaluer les propriétés pharmacocinétiques *in vivo* de nouvelles entités chimiques, destinées à être administrées chez l'homme, après administration unique ou répétée par voie systémique ou dermale chez le mini-porc et le rat. Ces procédures expérimentales vont permettre de déterminer la biodisponibilité du produit administré par voie systémique et dermale en support du choix de la voie d'administration utilisée dans les études de toxicologie. Les programmes d'évaluation des propriétés pharmacocinétiques doivent être réalisés sur les espèces utilisées pour l'évaluation de la toxicité non-clinique (rongeurs : rat et non-rongeur : mini-porc).

Avantages: La procédure expérimentale mise en œuvre permet de documenter les propriétés pharmacocinétiques *in vivo* du produit d'intérêt.

Les données obtenues contribueront à la sélection de molécules candidates et au choix de la voie d'administration utilisée dans les études de toxicologie.

Dommages escomptés: En accord avec les recommandations réglementaires internationales, il est nécessaire de documenter, au préalable des études cliniques, les propriétés pharmacocinétiques chez l'animal. La sélection de points limites appropriés (eu égard à la molécule testée) et l'utilisation d'un produit analgésique (si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux) seront prévues dans ce projet.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucun test réglementaire ou méthode *in vitro* validée scientifiquement reconnu par la législation de l'Union Européenne qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de pharmacocinétique adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux : conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces: Les espèces mini-porc et rat seront utilisées en raison de leur utilisation dans les études de toxicologie. Ces espèces sont utilisées en toxicologie en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence des outils d'analyses *ex vivo* spécifiques de ces espèces.

-Nombre d'animaux: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées :

Le nombre maximum de mini-porcs envisagé dans la procédure expérimentale incluse dans ce projet est de 8 animaux. Sur la base de cette procédure, pouvant être réalisée maximum 5 fois par an, un total maximum de 200 animaux pourra être utilisé sur une période de 5 ans.

Le nombre maximum de rats envisagé dans les procédures expérimentales incluses dans ce projet est de maximum 102 pouvant être réalisées maximum 5 fois par an, donc un total de 2550 sur une période de 5 ans.

-Conditions d'hébergement et de soins:

Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées (enrichissement) ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne en vigueur.

6480. La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie (animale telles qu'un être humain, végétale, fongique, bactérienne), qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties (ex: foie, rein, poumon, etc. chez l'animal).

Le toxicologue s'intéresse aux effets directs et indirects, immédiats et différés, à fortes et faibles doses, en exposition aiguë, sub-chronique ou chronique, d'une substance ou d'un mélange (effet "cocktail") sur les conditions externes et leurs effets délétères sur les communautés et organismes vivants, sur les organes, tissus, cellules ou organites et sur les gènes et la reproduction.

La tolérance est la propriété que possède l'organisme de supporter des doses d'une substance donnée sans manifester de signes d'intoxication. La tolérance locale doit être étudiée chez l'animal en utilisant la voie d'administration la plus pertinente compte-tenu de la voie d'administration qui est envisagée pour son utilisation future en clinique humaine. Son évaluation doit être réalisée préalablement aux premiers essais cliniques qui seront menés chez l'Homme.

L'objet de ce projet d'une durée d'un mois et donc d'étudier la tolérance d'un composé, candidat médicament pour le traitement de différentes formes de pathologies inflammatoires, administré en traitement unique par injection intrapéritonéale, c'est-à-dire dans la cavité abdominale.

Ces études de tolérance ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives. Elles sont effectuées sur un nombre réduit d'animaux préalablement à la réalisation d'études d'efficacité chez l'animal puis chez l'Homme afin de déterminer la dose maximale tolérée pouvant être utilisée sans induire de mortalité et donc sans remettre en cause les résultats de futures études.

Un total maximum de 20 rats femelles Wistar de 180 à 200 g sera nécessaire pour la réalisation de ce projet.

Les animaux seront répartis en 5 groupes de traitement avec 4 rats par groupe : 1 groupe non traité, 1 groupe traité avec le véhicule de mise en solution du composé à tester, et 3 groupes traités avec le composé à tester à 3 doses de 10, 50 et 250 mg/kg correspondant à des doses respectivement 1, 5 et 25 fois supérieures à celle qu'il est envisagé d'utiliser chez l'Homme. Les rats seront placés à jeun la veille de l'injection ou non du composé à tester aux différentes doses et du véhicule et l'aliment sera redonné aux animaux 3 heures après l'injection intrapéritonéale ou non. Les animaux seront observés et pesés régulièrement au cours de l'expérimentation permettant de voir les effets du composé sur l'évolution pondérale des animaux et sur leur comportement. Des prélèvements de sang seront effectués au niveau de l'extrémité de la queue des animaux pour étudier les effets du composé testé sur les paramètres hématologiques et biochimiques sanguins et pour déterminer la quantité de composé et de ses métabolites présents dans le sang.

Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'expérimentation par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique et l'ensemble des organes des cavités abdominales et thoraciques ainsi que le cerveau seront prélevés, pesés et fixés pour la réalisation d'analyses sur ces organes.

Les animaux seront hébergés à 2 par cage (48 x 27 x 20 cm) pendant toute la durée de l'étude, sans enrichissement pour ne pas influencer sur les paramètres mesurés au cours de l'étude. Des points limites définis spécifiquement seront suivis et toute atteinte de l'un ou de plusieurs de ces points limites entraînera l'euthanasie des animaux en conformité avec les recommandations éthiques.

Cette étude présente un enjeu socio-économique certain compte-tenu de l'incidence des pathologies inflammatoires 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.

6481. La dermatite atopique est une pathologie allergique touchant la peau et atteignant préférentiellement les enfants, de diagnostic clinique et dont le traitement est fonction des symptômes observés. C'est une maladie chronique qui évolue par poussées, entrecoupées de périodes calmes ou les lésions sont minimales.

Un peu moins du tiers des enfants est concerné. La dermatite atopique peut atteindre jusqu'à 10 % des adultes. Elle débute dans près de la moitié des cas avant le sixième mois et dans la majorité des cas, avant la cinquième année de l'enfant. Les lésions sont situées chez le nourrisson sur les convexités des joues, des membres et du cuir chevelu. Chez l'enfant plus âgé et l'adulte, les lésions siègent sur les plis de flexion des membres. Ces lésions se caractérisent par une sécheresse cutanée importante ou par des lésions

inflammatoires : éruption cutanée, desquamation de la peau et démangeaisons. Par ailleurs, l'inflammation cutanée peut se maintenir voire s'aggraver sous l'effet d'autres facteurs qui ne sont pas des allergènes : souvent des irritants tels que produits cosmétiques, vêtements en polyester...

La dermatite atopique survient dans le spectre de l'atopie, c'est-à-dire chez des sujets génétiquement prédisposés à l'allergie et à ses manifestations (formes allergiques de l'asthme, de la rhinite, de la conjonctivite, de l'urticaire, et l'allergie alimentaire). Dans 60 % des cas, un des parents est atopique.

La dermatite atopique comporte au minimum 3 phases différentes. Une première phase, apparaissant comme de l'eczéma sans signes de sensibilisation, peut durer toute la vie chez 20 à 30 % des patients atteints de dermatite atopique. Une deuxième phase, qui se présente comme la véritable dermatite atopique, avec sensibilisation, affecte 70 à 80 % des patients. Une troisième phase qui semble toucher seulement les patients atteints d'une véritable dermatite atopique et se caractérise par des signes de sensibilisation médiée par une immunoglobuline (IgE) à une protéine de l'organisme. Ensuite peut venir une phase variante d'auto-immunité. Des surinfections bactérienne, favorisée par le grattage, virale, dermatite de contact secondaire ou même retard de croissance peuvent survenir.

Le traitement des poussées de la dermatite atopique se fait en utilisant des dermocorticoïdes sous stricte surveillance médicale et des antihistaminiques en cas de démangeaisons associées. L'utilisation d'antibiotiques ou d'antiseptiques peut être nécessaire en cas de surinfection bactérienne, ainsi que l'utilisation d'antiviraux pour les surinfections virales.

Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant l'évaluation de l'efficacité de composés sur la dermatite atopique et sur le comportement (Remplacement) et nous utiliserons un nombre réduit d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience des modèles en Dermatologie et dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Le but de ce projet est de développer et valider aux niveaux pharmacologiques et comportemental un modèle de dermatite atopique chez la souris femelle BALB/c. Nous utiliserons un maximum de 80 souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines pour ce projet, réparties en 2 séries expérimentales.

La 1ère série expérimentale sera réalisée sur 32 souris, réparties en 4 groupes de 8 souris avec 1 groupe sans induction de dermatite atopique (SDA) et 3 groupes avec induction de dermatite atopique (ADA). Les procédures appliquées seront a) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse, b) des applications cutanées pendant 4 à 6 semaines (J1 à J42) d'un mélange acétone/huile pour le groupe SDA et d'un composé chimique, agent inducteur de dermatite atopique, dissout dans le mélange acétone/huile, pour les 3 groupes ADA, c) l'évaluation comportementale des animaux dans un champ ouvert (open-field) pendant 20 minutes 24 heures après la dernière application cutanée (J29, J36 ou J43) avec enregistrement vidéo (vidéo-tracking et vidéo classique) pour la quantification de différents paramètres, d) un prélèvement de sang avant à l'euthanasie des animaux pour le dosage de biomarqueurs (J43).

Les résultats de cette première série expérimentale détermineront la durée d'induction nécessaire à l'obtention d'une dermatite atopique associée aux différents biomarqueurs dosés.

La 2ème série expérimentale sera réalisée sur 48 souris pour la validation pharmacologique et comportementale du modèle de dermatite atopique. Les 48 souris seront réparties en 6 groupes de 8 souris : 1 groupe sans induction de dermatite atopique (SIP) traité avec une crème neutre, 1 groupe avec induction de dermatite atopique (AIP) traité avec cette même crème neutre, 3 groupes AIP traités avec des crèmes dermocorticoïdes d'activité faible, modérée, et forte, et un groupe AIP traité avec un composé anti-inflammatoire. Les mêmes procédures que celles décrites dans la 1ère série expérimentale seront utilisées, avec une procédure supplémentaire concernant le traitement des animaux par application cutanée des différentes crèmes dermocorticoïdes et neutre et anti-inflammatoire testés pendant les 7 derniers jours (définis selon les résultats de la 1ère série expérimentale) de l'expérimentation au cours de l'entretien de la dermatite atopique, l'évaluation comportementale étant effectuée à la fin de cette période d'entretien de la dermatite atopique et des traitements.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement). Des observations quotidiennes seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20%, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises, etc.) entraînera la sortie d'étude et l'euthanasie des animaux selon les recommandations éthiques.

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

6482. Un nombre important de composés chimiques sont retrouvés en entrée de stations d'épuration. Les traitements actuels sont peu efficaces pour traiter ce genre de composés et une majorité de ceux-ci sont retrouvés dans l'environnement.

Le présent projet a pour but d'évaluer la toxicité de différents micropolluants chez les larves de deux espèces modèles d'amphibiens: le xénope et le pleurodèle. Les expérimentations porteront d'une part sur l'évaluation de l'effet de cocktails de micropolluants à des concentrations faibles couramment retrouvées dans l'environnement. D'autre part, les expérimentations auront pour but d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de traitements innovants des eaux usées issues de stations d'épuration.

Les procédures mises en œuvre impliqueront des individus adultes de Xénope, des larves de Xénope et des larves de Pleurodèles. Les Xénope adultes seront uniquement utilisés à des fins de reproduction (stimulation hormonale de la ponte) et ne seront jamais euthanasiés mais réintégrés à l'élevage: utilisation de 20 adultes reproducteur pour l'ensemble du projet.

Les têtards (larves) des deux espèces d'amphibiens seront exposés à différents types de mélanges en micropolluants organiques (composés pharmaceutiques et phytosanitaires) ou à des effluents traités de station d'épuration pendant des durées variables (12 à 21 jours) et différents aspects seront étudiés : cassures de l'ADN, métamorphose, croissance.

De plus et afin de se rapprocher le plus possible du milieu naturel, des expérimentations seront menées en étudiant l'effet au niveau de chaînes alimentaires recréées en laboratoire.

Pour l'ensemble des procédures 3500 têtards de Xénope et 1110 têtards de Pleurodèles seront utilisés. Le nombre total d'animaux impliqué dans des procédures sera donc égale à 4630.

Afin de réduire le nombre d'animaux, les expérimentations seront regroupées au maximum et les conditions témoins seront mises en commun.

Du point de vue du raffinement, les conditions d'élevage et d'exposition des différents animaux seront strictement contrôlées en fonction des besoins physiologiques de chaque espèce et stade de développement afin de réduire le stress et la souffrance au maximum (exemple: période de repos après stimulation des reproducteurs). De même, un animal sera utilisé pour observer de nombreux biomarqueurs. Enfin une anesthésie stricte est utilisée à chaque fois.

6483. A l'heure actuelle, les écosystèmes d'eau douce sont les habitats les plus altérés par les activités humaines et de nombreuses espèces piscicoles sont susceptibles d'être impactées. Les activités humaines mènent à la dégradation de la qualité physico-chimique des cours d'eau, en particulier leur contamination croissante par de multiples substances et au réchauffement des masses d'eau dont les effets individuels et/ou combinés sur la faune aquatique sont encore mal connus. Evaluer et anticiper l'impact de ces facteurs de stress chimiques et thermiques sur les organismes aquatiques et en particulier les poissons d'eau douce représente donc un enjeu majeur pour la préservation du fonctionnement des milieux aquatiques. Des études récentes ont d'ores et déjà démontré que ces facteurs pouvaient induire des effets délétères sur les organismes aquatiques *via* l'altération de leurs capacités physiologiques et immunitaires. Cependant, les conséquences de la contamination du milieu et des changements globaux sur la résistance aux parasites et les capacités d'adaptation évolutive de la faune, et ce, à long terme sont encore peu étudiées. Par une approche interdisciplinaire à l'interface entre l'écophysiologie, la biologie évolutive et l'écotoxicologie, le projet proposé a pour objectif de déterminer les conséquences physiologiques et sanitaires des perturbations chimiques et thermiques sur les poissons d'eau douce. 3 espèces modèles ont été choisies : le carassin doré (*Carassius auratus*), pour son utilisation répandue en écotoxicologie et plus généralement dans l'étude de l'induction du stress chez les poissons, le goujon (*Gobio occitaniae*) et le chevaine (*Squalius cephalus*) pour leur forte représentation au sein des cortèges d'espèces communes observées dans le bassin hydrographique de la région Midi-Pyrénées. Ainsi, l'objectif de ce projet est d'évaluer la variabilité des réponses physiologiques de ces espèces face aux stress multiples *via* des expositions contrôlées en aquarium et *via* des expositions en cage dans la rivière (expérience *in situ*). Cette combinaison d'approches expérimentales et de terrain permettra ainsi d'apporter des connaissances fondamentales sur les conséquences d'une exposition à des stress multiples et sur les capacités d'acclimatation physiologiques de la faune piscicole aux stress actuels et futurs. Les procédures mises en œuvre impliqueront l'utilisation d'individus ayant tous atteint le stade adulte. Dans le cadre de chacune des procédures, le choix des espèces et des stades de développement des individus sera réalisé en accord avec les objectifs définis pour chacune des années incluses dans le projet. La capture et la mise en cage ou en aquarium des individus prélevés au sein du milieu naturel se dérouleront sur les sites présentant les plus grandes abondances afin de réduire au maximum l'impact des prélèvements d'individus sur la dynamique des populations/communautés inhérentes à chaque station. Les procédures mises en place, viseront à effectuer un suivi de l'état de santé des poissons exposés à différentes sources de stress : concentrations en contaminants environnementalement réalistes, élévation de la température et stimulation transitoire du système immunitaire par injection d'antigènes mimant une attaque parasitaire.

Dans le cadre des procédures d'encagement réalisées au sein du milieu naturel (*in situ*), ainsi que de celle réalisées en laboratoire, l'acquisition des données sera basée sur l'utilisation de techniques incluant des mesures morphométriques, des prélèvements sanguins et le dénombrement des parasites. Le nombre d'animaux impliqué pour chacune des espèces citées précédemment, à savoir le goujon, le chevaine et le carassin doré, s'élève respectivement à 1600, 480 et 640 individus, soit un total de 2720 animaux impliqués en 5 ans. En fin d'exposition (laboratoire et milieu naturel), les poissons seront anesthésiés puis euthanasiés selon les protocoles en vigueur afin de limiter au maximum la souffrance des animaux et de réaliser des analyses approfondies (analyses histologiques, physiologiques, prélèvement de tissus/organes pour dosages de contaminants). Enfin, les conditions d'exposition (paramètres physico-chimiques) et de maintien des différents individus (densité, sociabilité...) seront strictement contrôlées et répondront aux besoins physiologiques et éthologiques de chaque espèce étudiée. De même, afin de s'approcher au maximum des conditions naturelles et dans un souci d'éthique, les organismes seront soumis à des niveaux de stress environnementalement réalistes et modérés.

6484. Ce projet a pour objectif de confirmer qu'il y a bien transfert du cortisol du sang à la laine chez les ovins pour des analyses ultérieures. Pour cela 12 animaux seulement seront utilisés (6 en traitement et 6 témoins). L'effectif de 6 étant le minimum pour, malgré la variabilité individuelle, permettre d'obtenir une des résultats tangibles. Il s'agit de mâles castrés de race Texel âgés de 2 à 5 ans. Il est également prévu la mise au point du dosage du cortisol dans cette matrice notamment au niveau du traitement de l'échantillon pour en extraire le cortisol. Si le cortisol se dépose dans la laine, celle-ci pourra être utilisée pour évaluer la cortisolémie et le prélèvement serait ultérieurement non invasif et moins douloureux qu'un prélèvement de sang. L'objectif est donc de remplacer l'utilisation du plasma par celui de la laine (moins invasif) qui doit permettre également de prélever moins de volume d'échantillon puisque la réponse en cortisol pourrait être cumulative dans les phanères et caractériser une période de temps d'exposition plus longue qu'avec les prélèvements sanguins. En guise de raffinement pour ces actes très peu contraignants, les animaux seront habitués au début du projet à la gestuelle pour le prélèvement de sang et de laine.

6485. La polyarthrite rhumatoïde est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires. Cette pathologie touche les articulations mobiles telles que les articulations des mains, des pieds, les poignets et les genoux. Elle est caractérisée par une inflammation articulaire et une destruction progressive des structures cartilagineuses et osseuses. C'est une maladie douloureuse qui affecte la qualité de vie des patients et qui peut provoquer un isolement social. Plusieurs traitements contre la polyarthrite rhumatoïde, notamment les biothérapies, sont actuellement utilisées. Mais des résistances et des échappements thérapeutiques sont fréquents. Ainsi, il y a une nécessité de trouver de nouveaux traitements et de comprendre les mécanismes d'action, et notamment les mécanismes cellulaires, de ces traitements. La molécule PX17, un nouveau traitement ayant des effets anti-inflammatoires, a montré son efficacité contre la polyarthrite rhumatoïde. Cependant les mécanismes expliquant son efficacité n'ont que peu été étudiés.

Une analyse approfondie des travaux publiés dans la littérature ainsi que des analyses réalisées sur des modèles cellulaires nous font émettre l'hypothèse que le PX17 pourrait agir *via* une action sur le microbiote et l'immunité intestinale. En effet, une catégorie de lymphocytes spécifiques de l'auto-immunité et donc de la polyarthrite (cibles de PX17) est, en condition physiologique, en charge du contrôle du microbiote intestinal. Ainsi, cette étude a pour objectif d'étudier les populations cellulaires intestinales et le microbiote intestinal au cours du développement d'une arthrite induite au collagène de type II chez des souris traitées au PX17. Au cours de cette étude nous comparerons le microbiote intestinal et la répartition de différentes populations de lymphocytes au sein de l'intestin et des articulations chez des souris saines, saines traitées au PX17, arthritiques et arthritiques traitées au PX17. Aucun modèle cellulaire ou informatique ne pouvant reproduire le développement de la polyarthrite et notamment sa phase immunologique, le recours aux animaux est nécessaire (Remplacement). Ce modèle de polyarthrite au collagène chez la souris est un modèle connu et considéré comme le gold-standard des modèles de polyarthrite.

Chaque groupe sera composé de 8 souris (nombre nécessaire et suffisant, ainsi au total 32 souris seront nécessaires à chaque expérience ; le protocole sera effectué deux fois afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. Les rongeurs utilisés pour cette étude sont nés et ont été élevés dans des établissements agréés. Leur nombre (64) a été réduit au minimum nécessaire pour détecter un effet statistique.

Tout au long de l'étude, quotidiennement les paramètres cliniques (poids, score de sévérité de la maladie) seront suivis afin de déterminer la sévérité de la maladie et l'état général de l'animal (prostration, absence de soins, pelage hérissé) sera observé pour évaluer la douleur des animaux et des mesures seront prises en conséquence. La sévérité de la pathologie est déterminée par calcul d'un score clinique qui permet de connaître un point limite. Le score de l'arthrite prend en compte le gonflement et la rougeur des pattes. Le score maximal est de 16, les animaux atteignant un score de 12 seront euthanasiés. Une perte de poids importante (supérieure à 20% du poids initial) sera considérée comme un second point limite. Aucun effet secondaire du traitement administré *per os* n'est attendu. En effet la molécule PX17 a déjà subi de nombreux tests précliniques publiés selon les mêmes modalités. Des prélèvements de selles (non-invasives) seront effectués deux fois par semaines pour l'étude du microbiote intestinal par séquençage. La répartition des différentes populations lymphocytaires au sein de l'intestin et des articulations sera étudiée en cytométrie en flux et immunohistochimie à la fin du protocole d'arthrite sur les animaux euthanasiés. La sévérité de l'arthrite sera confirmée par des analyses histologiques.

6486. Le développement des résistances bactériennes aux antibiotiques est une problématique de santé publique mondiale. Elle est la capacité d'un microorganisme à résister aux effets des antibiotiques. Les bactéries disposent de nombreux mécanismes de résistance contre des molécules toxiques auxquelles elles sont naturellement confrontées dans leur environnement. Le cas le plus fréquent est une adaptation, qui naît de mutations génétiques aléatoires, ou qui fait suite à des échanges de gènes de résistances entre des bactéries. Si une bactérie est porteuse de plusieurs gènes de résistance pour différents antibiotiques, elle est dite « multi résistante ». La majorité des antibiotiques (tétracyclines, sulfamides, phénicolés, fluoroquinolones et céphalosporines) sont consommés par les animaux d'élevage avicoles, mais aussi porcins et cunicoles (80% aux USA, Food Drug Administration or FDA, 2009, Rapport ANSES : Usage des antibiotiques en filières porcine, avicole et cunicole en France – résultats d'enquêtes, 2012). Cependant, l'utilisation des antibiotiques dépend de certaines caractéristiques des élevages (relatives à la biosécurité, aux règles d'hygiène et de zootechnie ou à la perception individuelle des antibiotiques). L'utilisation des antibiotiques, actuellement, dans les élevages avicoles est trop importante et conduit à l'émergence de résistance chez les bactéries pathogènes à risque pour la santé humaine, voire des bactéries du microbiote digestives de la volaille. Aujourd'hui, c'est toujours un problème en termes de santé publique et de consommation des aliments, d'où la nécessité de mettre rapidement sur le marché de nouveaux. L'utilisation de produits alternatifs aux antibiotiques est une priorité nationale, européenne et internationale. Le principal problème de l'utilisation des antibiotiques est la sélection potentielle de souches bactériennes résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques et ayant un impact sur la santé humaine. Devant l'absence de solutions pérennes, le développement d'alternatives aux antibiotiques dans les élevages est indispensable. En cinq ans, des solutions commencent à émerger à travers notamment l'utilisation d'extraits végétaux en complément alimentaires.

Dans ce contexte, ce projet a pour objectif la mise au point de solutions alternatives aux antibiotiques à base d'extraits végétaux pour prévenir et/ou traiter l'infection par une bactérie responsable de zoonose qui peut être transmise par la viande de poulet : *Campylobacter*. Cette bactérie a la particularité de présenter de nombreuses résistances aux antibiotiques utilisés dans les élevages, comme démontré par les travaux publiés par l'Agence Nationale de la sécurité alimentaire, de l'environnement et du travail. Les extraits végétaux ont été sélectionnés *in vitro* lors de travaux de recherche préalables.

Le projet consiste à :

- 1/ formuler des produits vectorisés utilisant les actifs naturels sélectionnés, et caractériser leur mode d'action,
- 2/ les tester *in vivo* de manière à déterminer les doses actives et le mode d'emploi en élevage de poulet de chair.

Le projet consistera en plusieurs expérimentations sur poulets de chair ROSS PM3 (lignée aviaire sensible aux *Campylobacters*). Suite à ce projet, les produits seront destinés dans un premier temps au marché de la nutrition animale et éventuellement dans un

second temps celui de la santé humaine. Ces produits sont commercialisés et utilisés depuis plusieurs années en nutrition animal avec des fonctions bien précises sur la croissance des volailles et le bien-être des animaux. Des travaux récents ont montré que certains de ces mêmes produits présentaient une activité antibactérienne. Notre partenaire privé a fait un choix stratégique de cibler les deux marchés.

L'objectif de cette demande d'avenant est une prolongation du projet afin de réaliser une dernière expérimentation sur 5 semaines avec 160 poussins ROSS PM3 supplémentaires. Celle-ci n'a pu être réalisée à partir de la demande d'autorisation initiale (920 poussins).

Remplacement : il n'existe aucune méthode alternative pour évaluer le portage du *Campylobacter* avec ou sans traitement, donc il est impossible de remplacer les poulets.

Réduction : le nombre d'animaux inclus dans cet avenant a été déterminé dans les mêmes conditions que les précédentes expérimentations du projet.

Raffinement : il y aura un enrichissement social (vie en groupe et visite biquotidienne des animaliers) et de structure d'enrichissement (perchoirs, lampes chauffantes et objets suspendus).

6487. Malgré les grands progrès réalisés dans la prévention, le diagnostic et le traitement du cancer du sein, en France 54000 nouveaux cas ont été diagnostiqués chez les femmes en 2015 et environ 12000 en sont décédées. C'est une maladie très hétérogène, classée en plusieurs catégories prenant en compte les caractéristiques moléculaires, le stade d'évolution, la localisation de la tumeur et des tissus à partir desquels elle s'est développée. Le cancer du sein triple négatif (TNBC pour Triple-negative breast cancer) qui représente environ 15-25% de tous les cancers du sein, est un type de cancer particulièrement agressif et est associé à un mauvais pronostic. Il est caractérisé par la faible ou l'absence d'expression des récepteurs de l'estrogène et de la progestérone, ainsi que du récepteur Her-2 et de ce fait, les patientes atteintes de TNBC ne peuvent bénéficier de thérapies ciblées contre ces molécules. De plus, même si ces cancers peuvent répondre fortement aux autres chimiothérapies conventionnelles utilisées, ils présentent un risque très élevé de rechute et de dissémination métastatique.

Des études récentes menées dans notre laboratoire montrent qu'après traitement des patientes TNBC par chimiothérapie une réponse immunitaire peut se déclencher et induire l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes (TILs pour tumor infiltrating lymphocytes) et que la présence de ces TILs antitumoraux était corrélée avec un bon pronostic de survie à 5 ans. Une analyse comparative du profil génomique de ces patientes a notamment mis en évidence un gène dont l'expression est fortement augmentée chez les patientes présentant peu d'infiltrats lymphocytaires, suggérant que la surexpression de ce gène pourrait inhiber l'attraction des cellules immunitaires dans les tumeurs.

Nos résultats préliminaires *in vitro* montrent que ce gène joue un rôle dans la sensibilité des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques. Nous souhaitons maintenant déterminer *in vivo* l'implication de ce gène dans l'inhibition de l'infiltration des cellules du système immunitaire dans les tumeurs. Pour ceci, la première étape a été de supprimer son expression dans la lignée de tumeur du sein murine 67NR. Nous souhaitons injecter ces cellules exprimant (67NR parentales) ou non (67NRKO) le gène étudié dans des souris afin d'étudier *in vivo* si son expression est impliquée dans l'attraction des cellules immunitaires dans la tumeur. Une partie des souris sera traitée par chimiothérapie dès l'apparition des tumeurs. L'utilisation du modèle animal murin est le seul moyen d'étudier *in vivo* le rôle du gène étudié dans l'inhibition de l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes et qui pourrait constituer une cible pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les cancers de type TNBC.

Le but de ce projet est de déterminer l'implication du gène HLF (pour Hepaticleukemia factor) dans l'inhibition de l'infiltration des tumeurs du sein par les lymphocytes. Des études biostatistiques ont montré que lorsque ce gène est surexprimé dans les cellules tumorales de patientes souffrant de cancer de type TNBC, une inhibition de l'attraction lymphocytaire est constatée et corrélée à un mauvais pronostic. L'étude *in vivo* de l'infiltration lymphocytaire de tumeurs du sein induites chez la souris exprimant ou non HLF est indispensable afin de confirmer le rôle joué par ce gène dans ce processus et qui pourrait devenir une cible pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, l'étude de ces infiltrations en rapport avec l'immunité ne peut se faire que dans un animal entier. Le projet nécessitera l'utilisation de 300 souris femelles. Ce nombre est requis pour atteindre la pertinence statistique et obtenir une réponse significative. Toutefois, si les expériences menées sur une première série de souris dans chaque lot sont très concluantes et donnent des résultats significatifs et robustes le nombre de souris par lot sera réduit. Les souris seront élevées et maintenues dans le souci de leur bien-être (milieu enrichi, surveillance quotidienne et précise des souris). Les souris seront euthanasiées par des méthodes éthiques, réglementaires pour l'expérimentation ou dès qu'elles auront atteint un point limite.

6488. L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumorales repose sur l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde morbidité. Il a été démontré récemment que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumorales conventionnels (anthracyclines ou oxaliplatine) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqué dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein ou colorectaux, recevant respectivement des anthracyclines ou de l'oxaliplatine. Le but de ce projet est d'explorer des stratégies de compensation des effets provoqués par l'absence des gènes FPR1. La réponse à cette question ne peut être obtenue qu'*in vivo* car l'étude de l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale nécessite l'intégralité des interactions moléculaires et immunitaires dans un organisme vivant entier.

Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris normales et aussi des souris transgéniques ayant un gène FPR1 totalement ou partiellement invalidé. Elles présentent un phénotype complètement normal. Ce projet se déroulera sur 5 ans et implique des expériences de croissance tumorale sur 540 animaux.

Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Le milieu environnemental des animaux est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou maisons en cartons. Les animaux sont observés quotidiennement afin de détecter tout problème ou signe de mal-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Le personnel assure une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet vise à une meilleure compréhension de la fonction de FPR1, un facteur pronostic négatif pour la réponse aux traitements anti-carcéaux à base d'anthracyclines, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de cancer du sein.

6489. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet du microbiote dans le développement et l'efficacité de traitements anti-cancéreux inducteurs de mort cellulaire immunogène (ICD : immunogenic cell death). Ce projet veut aussi s'attaquer à mieux connaître l'effet de la restriction calorique (sous forme de jeûne), ou en utilisant des agents mimant la restriction calorique. Dans le contexte du mécanisme de mort cellulaire immunogène, et de restriction calorique, le but est de connaître aussi l'importance de la constitution de la flore intestinale dans l'établissement de la réponse immunitaire anti-tumorale.

En effet, il a été montré :

1.) que la diminution des nutriments, connue sous le nom de restriction calorique a des bénéfices pour la santé et augmente la durée de la vie moyenne. Une de nos hypothèses est que cette restriction de l'apport en nutriments est une façon physiologique de déclencher l'autophagie.

2.) que les agents imitant la restriction calorique sont des produits qui miment les effets biochimiques et fonctionnels de la restriction calorique, et qu'administrés en combinaison avec les traitements anti-cancéreux ils permettraient d'améliorer l'efficacité du traitement notamment par régénération de cellules immunes.

3.) que la flore intestinale peut jouer un rôle important dans l'établissement de la réponse immunitaire anti-tumorale.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'effet du microbiote dans l'efficacité (*via* la réponse immunitaire anti-tumorale) de traitements anti-cancéreux inducteurs de mort cellulaire immunogène combinés à des composés capables d'imiter les effets biochimiques du jeûne.

Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car un organisme vivant entier est indispensable pour étudier l'implication du système immunitaire sur de la croissance tumorale, dans le contexte du microbiote intestinal et de toutes les interactions moléculaires déclenchées par la restriction calorique. Pour ce faire, nous projetons d'utiliser des souris C57Bl/6 et Balb/c (maximum de n=7040). Ce projet se déroulera sur 5 ans et impliquera des études de croissance tumorale et des analyses immunologiques et du microbiote *ex vivo*. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de réduction et de raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Le nombre d'animaux par groupe sera de 8 ou 12 (selon les procédures envisagées) et les expériences seront effectuées pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. Le projet regroupe 4 procédures séquentielles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les animaux bénéficieront d'un environnement enrichi en permanence à l'aide de coton et de maisons en carton. Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter tout problème lié aux procédures ou non. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

6490. Les cellules de la couche intermédiaire entourant la paroi artérielle (la media) sont appelées cellules musculaires lisses vasculaires. Leur multiplication anormale participe à l'obstruction progressive de la lumière artérielle appelée l'hyperplasie intimale. Cet événement qui peut être associé à des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-tendant ce processus ne sont pas complètement élucidés, compliquant ainsi la prévention de ce risque pathologique. Un certain nombre de facteurs de croissance et de cytokines ont été identifiés comme jouant un rôle dans ce processus. Parallèlement, des constituants de la matrice extracellulaire entourant les cellules sont également susceptibles d'influencer la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. C'est le cas d'une protéine de l'hémostase, le facteur vonWillebrand. Il participe à l'adhésion plaquettaire intervenant après une lésion vasculaire lorsque la couche interne de la paroi artérielle (endothélium) a disparu. Il est produit par les mégacaryocytes et les cellules endothéliales ; ces dernières représentant la principale source du facteur vonWillebrand circulant dans le plasma. Diverses études ont décrit un lien entre le facteur von Willebrand et les cellules musculaires lisses vasculaires. Par exemple, une accumulation de facteur von Willebrand a été observée au niveau de la media après 24H dans un modèle d'obstruction progressive de la lumière artérielle induite par un manchon en silicone au niveau de l'artère carotide de lapin.

Il est également à souligner qu'une déposition de vonWillebrand au niveau de l'intima a également été observée dans différentes conditions : i) au niveau de plaques d'athérosclérose, ii) suite à une angioplastie et iii) sur des greffons aortiques sténosés.

Dans ce contexte physiopathologique, nous nous intéressons d'une part à l'implication du facteur vonWillebrand dans le développement vasculaire normal, et d'autre part, aux mécanismes pouvant expliquer le rôle du facteur vonWillebrand dans la formation de la néointima, et l'interaction facteur von Willebrand-cellules musculaires lisses vasculaires dans un modèle d'hyperplasie intimale.

Les résultats préliminaires de nos collaborateurs *in vitro* ont montré une accumulation du facteur vonWillebrand à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires et un effet prolifératif important du facteur von Willebrand sur les cellules musculaires lisses vasculaires en culture. Nous proposons une étude visant à explorer la relation facteur vonWillebrand-cellules musculaires lisses vasculaires. Nous identifierons les récepteurs cellulaires impliqués, les voies de signalisation mises en jeu et les déterminants protéiques côté facteur vonWillebrand, avec des cellules saines et pathologiques. La pertinence de nos résultats sera testée *in vivo* dans un modèle d'hyperplasie intimale chez des souris avec variation qualitative ou quantitative en facteur vonWillebrand. Pour cela, nous mettrons en place un modèle de « dé-endothélisation et ligature de l'artère fémorale commune en aval » (hyperplasie intimale) chez 20 souris contrôles et 20 souris déficientes pour le facteur vonWillebrand et reproduisant la maladie de Willebrand de type 2B. Ce projet évaluera la mécanique artérielle par échographie et le phénotype vasculaire (au niveau de l'artère fémorale) par coloration histologique des artères des deux souches de souris en présence ou non d'une lésion fémorale.

Le nombre d'animaux par groupe est réduit à son maximum en respectant les contraintes de publication, sans compromettre les objectifs du projet et pour permettre de bonnes analyses statistiques.

Les études statistiques antérieures ont montré que des groupes de 8 à 10 animaux sont en moyenne requis pour obtenir une distribution normale des mesures.

La lésion fémorale se fera sous anesthésie (isoflurane) et la prise en charge de la douleur se fera par injection de lurocaïne. Le protocole durera 3 semaines post-chirurgie. A la fin du protocole, la mécanique artérielle sera évaluée par echotracking chez l'animal anesthésié. Après euthanasie, la fémorale sera prélevée pour étudier l'hyperplasie intimale par coloration histologique sur des coupes sériées. Une observation quotidienne des animaux en expérimentation sera réalisée. L'état général de l'animal sera évalué : prise de nourriture, et mouvements habituels sont considérés comme des signes de bonne santé. La douleur sera évaluée par les signes de prostration, de perte d'appétit ou de poids et de mouvements pénibles. L'environnement des animaux sera enrichi pour éviter l'angoisse. Si un animal présente un amaigrissement associé à une prostration ou un comportement anormal, il sera sorti du protocole et euthanasié après anesthésie.

6491. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un virus qui peut, dans certaines conditions, rendre cancéreuse la cellule qu'il infecte. Il est ainsi associé à différentes pathologies tumorales comme le lymphome de Burkitt, les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD) ou le carcinome nasopharyngé (NPC). L'ADN viral est retrouvé dans toutes les cellules cancéreuses où certaines protéines dites « de latence » sont exprimées. L'infection par EBV est fréquemment associée à la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, et bien que de nombreuses études aient été consacrées à ce phénomène, il reste encore de nombreuses inconnues liées à la variabilité d'expression des protéines virales et à la diversité des tumeurs impliquées. Notre projet consiste à étudier les mécanismes impliqués dans la résistance des cellules EBV+ à différents traitements et à mettre en place des stratégies pour contourner cette résistance. Nos résultats montrent qu'ABT-737, un inhibiteur de Bcl-2 et de Bcl-xl (membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2), est efficace, utilisé seul ainsi qu'en combinaison avec des traitements conventionnels chez la souris xénotreffée avec des cellules lymphoblastoïdes (modèle pour les PTLD). Néanmoins, ces cellules expriment fortement Bcl-xL et Mcl-1, protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, qui participent à la résistance à ABT-737. La suite du projet vise donc à étudier un inhibiteur de Mcl-1, que nous appellerons « composé A » seul et en combinaison avec les traitements de référence, dont les résultats *in vitro* sont très prometteurs. La croissance tumorale et son inhibition sont des processus qui dépendent aussi du système immunitaire et qui sont sous le contrôle de cytokines et d'interleukines dans un organisme complet. De plus, le micro-environnement tumoral ne peut pas encore être reproduit correctement *in vitro*. Enfin, certains agents comme le cyclophosphamide (traitement de référence inclus dans les tests) doivent être métabolisés *in vivo* pour être efficaces et ne fonctionnent donc pas *in vitro*. D'autres, comme les anticorps monoclonaux nécessitent certains acteurs du système immunitaire de l'animal pour être actifs. L'utilisation d'animaux vivants est donc indispensable.

Pour ce projet, nous inclurons 120 souris, ce qui nous permettra une analyse statistique correcte des différents résultats. Ces études seront réalisées dans différents modèles de tumeurs associées à EBV : PTLD et lymphome de Burkitt. Nous espérons que la molécule permettant d'inhiber les membres de la famille de Bcl-2 pourra constituer à terme une alternative thérapeutique dans le traitement des pathologies B associées à EBV.

Pour ce projet, le nombre de souris est restreint au minimum pour que le test statistique non paramétrique, comme le Kruskal-Wallis, de cette étude soit valide.

Nous porterons une attention très particulière quant au bien-être des souris et les points limites seront strictement appliqués. Toutes les procédures seront faites sous anesthésie locale ou générale. Il s'agit de mesures de croissance de cellules tumorales inoculées par voie sous-cutanée, ainsi que de mesure de l'efficacité du traitement exploré par comparaison avec les traitements de référence.

6492. L'ostéosarcome est la 1<sup>ère</sup> cause de tumeurs malignes primitives de l'os et touche principalement des adolescents et jeunes adultes. Après les progrès majeurs apportés par la chimiothérapie dans les années 70-80, la survie depuis les années 90 n'a que peu été améliorée et reste autour de 60-70% à 5 ans. De plus, la réponse histologique aux traitements standards par chimiothérapie s'est révélée être un facteur pronostique majeur du risque de récurrence. Dans l'ostéosarcome, les récurrences sont habituellement des



métastases et le plus souvent localisées au niveau pulmonaire. Le traitement actuel de l'ostéosarcome est une combinaison de chirurgie et de chimiothérapie, mais le pronostic reste faible en raison de la chimiorésistance et des métastases précoces. L'ensemble de ces données soulignent l'importance de comprendre les stratégies adoptées par ce type de tumeurs pour contourner l'effet anti-tumoral des chimiothérapies et aboutir à ces récidives métastatiques et à la résistance au traitement.

*In vitro*, nous avons développé des modèles cellulaires résistants aux différentes chimiothérapies utilisées dans cette maladie. A partir de ces lignées, nous souhaitons évaluer l'activité de ces traitements de référence et explorer la chimiorésistance de nos tumeurs. L'objectif est de mieux comprendre les mécanismes de résistance pour déterminer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui permettraient d'augmenter la survie des patients atteints d'ostéosarcome. Dans ce projet nous envisageons de greffer 7 lignées cellulaires et de traiter les modèles avec des médicaments actuellement utilisés dans le traitement de l'ostéosarcome pour étudier les facteurs mis en cause dans la résistance.

Il est actuellement impossible de remplacer les modèles expérimentaux *in vivo* par des méthodes alternatives car elles ne traduisent pas correctement le développement de la maladie et particulièrement l'environnement osseux nécessaire à ce type de tumeur. Néanmoins, nous grefferons les cellules directement dans le tibia des souris. Nous utiliserons les résultats fournis par les tests *in vitro* précédemment réalisés pour limiter le nombre d'animaux employés. Ce projet utilisera au maximum 680 souris. 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 et également en cours de développement de la maladie. Les souris seront hébergées en groupe et l'environnement sera enrichi avec du « cocoon ».

6493. Les fièvres hémorragiques virales (FHV) posent un grave problème de santé publique et représentent une menace croissante pour la santé publique. La récente épidémie de FH à virus Ebola en Afrique de l'Ouest est le parfait exemple du manque de moyens de lutte contre ces agents infectieux. Parmi les FHV, la fièvre de Lassa (FL) est l'une des plus préoccupantes. Elle est due au virus Lassa qui est endémique en Afrique de l'Ouest et responsable de 300.000 cas et 6.000 décès par an. La physiopathologie et les réponses immunes associées à la survie ou à la mort sont inconnues. En raison de son incidence croissante, de sa sévérité dramatique, du manque de traitements et d'outils de diagnostic, il est donc urgent de mieux comprendre la pathogénèse de la fièvre de Lassa et les réponses de l'hôte impliquées dans son contrôle ou dans son dérèglement. Dans ce projet nous proposons d'étudier les événements pathogéniques précoces associés à la FL et de les corrélés avec l'issue de la maladie en utilisant comme modèle le singe cynomolgus. Les résultats attendus sont non seulement d'obtenir des marqueurs biologiques précoces d'infection afin de confirmer le plus tôt possible une éventuelle infection et le devenir de celle-ci, mais plus généralement de comprendre la physiopathogénèse et les réponses immunes mises en jeu au cours de la fièvre de Lassa et des différentes issues de la maladie. Ces éléments permettront d'ouvrir la voie à de nouvelles approches vaccinales ou thérapeutiques et amélioreront considérablement les capacités diagnostiques pour mieux faire face aux épidémies sur le terrain.

Ce projet mettra à profit le modèle de singe cynomolgus afin d'y réaliser des investigations profondes en se focalisant sur les événements qui surviennent dans les jours qui suivent l'infection et en utilisant des techniques moléculaires de pointe afin d'atteindre les objectifs précédemment décrits. Par conséquent, les primates seront infectés par le virus Lassa.

Dans le cas des FHV, y compris la FL, il est impossible de remplacer les modèles animaux afin de réaliser des études sur la physiopathogénèse et les réponses immunitaires, qui nécessitent des organismes entiers. Afin de limiter au maximum l'utilisation de modèles animaux, nous utilisons depuis plus de 10 ans des modèles alternatifs *in vitro* qui nous ont permis des avancées importantes sur la compréhension des interactions du virus avec son hôte. Cependant, beaucoup de questions ne peuvent être résolues en utilisant ces approches *in vitro* et nécessitent un organisme entier. De plus il n'existe pas de modèles rongeurs capables de reproduire la physiopathogénèse et les réponses immunitaires retrouvées chez l'Homme au cours de la FL. Les primates non humains sont les seuls modèles pertinents qui reproduisent les symptômes de la FL retrouvés chez l'Homme et sont donc les seuls pouvant être utilisés pour cette étude.

Pour ce faire, un total de 28 animaux seront utilisés dans ce projet et les primates seront répartis dans 3 procédures expérimentales. Au cours du projet, un groupe de primates infectés (dont 3 animaux contrôles non infectés) seront suivis tout au long de la maladie pour étudier de manière exhaustive les caractéristiques cliniques, biologiques, virologiques et immunologiques au cours de la progression complète de la maladie. Trois autres groupes de singes seront également infectés puis euthanasiés à 2, 5 et 11 jours post-infection afin d'étudier et de caractériser respectivement la FL pendant les événements qui surviennent très rapidement après l'infection, au cours de la phase d'incubation et au pic de la maladie.

Dans le but de raffiner, nous prévoyons de réaliser une analyse exhaustive pour parfaitement exploiter le matériel biologique issu de nos modèles afin de répondre à un maximum de questions possibles. Un vétérinaire réalisera quotidiennement le suivi médical des animaux et apportera des soins appropriés si besoin. Une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire, de confort et de stimulation. De plus, notre laboratoire a déjà réalisé des expériences similaires avec ce modèle. Par conséquent, le point limite de souffrance des animaux est parfaitement caractérisé et notre expérience aidera à réduire au maximum la souffrance des animaux. Enfin, le nombre d'animaux a été réduit autant que possible pour obtenir des résultats interprétables et statistiquement pertinents tout en gardant à l'esprit les différentes issues de la maladie chez notre modèle.

6494. L'autorisation de mise sur le marché (AMM) d'un produit (médicament, agent de contraste...) nécessite au préalable de caractériser notamment sa pharmacocinétique et sa pharmacodynamique.

La pharmacocinétique consiste à évaluer l'absorption, la diffusion, la métabolisation et l'excrétion du produit par l'organisme. Elle permet notamment d'améliorer les dosages et la posologie du produit par l'étude de sa concentration sanguine au cours du temps.

Elle permet également de déterminer les voies d'administrations optimales selon la métabolisation du produit dans l'organisme.

La pharmacodynamique consiste quant à elle à évaluer les effets du produit sur l'organisme.

Ce projet a pour objectif de caractériser la pharmacocinétique et la pharmacodynamique après administration de produits chez le lapin et le rat.

Il n'existe pas de méthode alternative à l'heure actuelle permettant de modéliser de manière fiable l'évolution et les effets d'un produit dans un organisme vivant. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire à l'objectif de ce projet.

Le recours à l'imagerie médicale (imagerie à rayons X ou imagerie optique) dans ce projet permet de suivre au cours du temps la distribution de produits radio-opaques ou rendus fluorescents de manière quantitative et spatiale. Cette méthode d'analyse présente l'avantage d'être non invasive, nécessitant seulement une anesthésie générale. Elle permet également de suivre un même animal au cours du temps et donc de diminuer l'impact de la variabilité individuelle sur les résultats et de réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Au sein de ce projet, 124 lapins et 126 rats au maximum seront utilisés et répartis sur 5 études de caractérisation de produits.

Dans la mesure du possible, les animaux seront hébergés en groupes en enclos pour une plus grande liberté de mouvement et pour favoriser leur comportement naturel exploratoire et social. En cas d'hébergement individuel, les cages seront organisées de manière à permettre à minima un contact olfactif et visuel avec les lapins adjacents. Des enrichissements nutritifs seront disposés dans les cages afin de pallier aux risques de carences.

Les produits à évaluer seront injectés sous anesthésie afin d'éviter de stresser les animaux.

Des points limites ont été définis afin d'évaluer la souffrance et limiter la douleur des animaux. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place.

6495. La maladie d'Alzheimer comporte plusieurs dysfonctionnements cellulaires tels que l'hyper-phosphorylation ou l'agrégation de petites protéines. Ces protéines sont normalement éliminées par la cellule mais en conditions pathologiques, ces protéines sont présentes en excès, clivées sous plusieurs formes qui peuvent être très toxiques. Le but du projet est d'étudier des enzymes potentiellement responsables de la coupure de ces protéines. Plusieurs études ont pu observer un impact très délétère de ces formes clivées et notre laboratoire a montré par une approche pharmacologique, qu'un enzyme candidat est capable de cliver ces peptides. Ce projet permettrait de connaître les enzymes responsables de l'aggravation de la maladie et serait une voie thérapeutique pour la santé humaine. Pour respecter les 3Rs, ce projet comporte le remplacement avec les études *in vitro* et *ex vivo*, la réduction avec l'utilisation d'un logiciel statistique simulant le nombre d'animaux requis selon les expériences (transgénique ou non, n= 950) et le raffinement avec l'utilisation d'analgésique et le suivi des animaux par l'expérimentateur. Ces souris seront indispensables pour avoir un système intégrant la maladie d'Alzheimer en présence ou en absence de nos enzymes candidats. Notre projet se compose de trois procédures majeures où l'on injectera une particule virale après la naissance des souris (post-natal), à 6 mois permettant de réduire la quantité des enzymes candidats dans le cerveau (donc d'inhiber la pathologie) et où l'on administrera un inhibiteur pharmacologique. L'ensemble de nos modèles murins (wildtype, double-transgéniques, triple-transgéniques) subiront successivement des tests comportementaux et une euthanasie pour les analyses biochimiques et histologiques à 8 et 12 mois pour analyser l'effet de notre administration. Le modèle triple-transgéniques développe la pathologie de type symptomatique à partir de 6 mois même si les protéines en excès sont présentes depuis le 3ème mois. En ce qui concerne le modèle double-transgénique, cela correspond à une variante des souris triple-transgéniques avec la présence seulement des mutations sur APP et sur Tau. Ces souris montrent un phénotype moins sévère que les souris triple-transgéniques d'un point de vue comportemental et biochimique. Chaque souris sera préalablement anesthésiée avant son euthanasie pour éviter toute douleur. Pour être en accord avec la réglementation, l'expérimentateur mettra en œuvre des actions précoces et adaptées à chaque point limite observé afin de respecter le bien-être animal.

9496 L'objectif global de notre projet est de contribuer à la compréhension des processus d'encodage et de stockage des mémoires chez les mammifères. Nous souhaitons étudier spécifiquement les mécanismes sous-jacents à la formation de la mémoire à long terme dans une zone spécifique du cerveau. Cette zone du cerveau a été impliquée dans plusieurs maladies humaines. Une meilleure compréhension de son fonctionnement en conditions normales est nécessaire afin d'identifier et comprendre les altérations, qui se manifestent en conditions 'anormales', telles que les maladies neuro-développementales ou neuro-dégénératives. Notre approche innovante consiste à étiqueter les cellules activées lors d'une tâche comportementale. Cet étiquetage permet l'identification des cellules, jouant un rôle clé dans la réalisation de cette tâche, et peut-être dans l'encodage de la mémoire de cette dernière. Nous proposons ensuite d'étudier les propriétés et caractéristiques de ces cellules, afin de développer la notion d'une signature ou 'carte d'identité' pour ces cellules. Nous proposons également de manipuler leur activité, afin de confirmer leur rôle dans la performance mnésique liée à cette tâche. L'utilisation d'un modèle animal, plus particulièrement la souris, est indispensable pour la réalisation de ce projet important : 1) notre projet vise à comprendre les mécanismes sous-jacents la formation et stockage de la mémoire ; l'utilisation de systèmes complexes et entiers sont absolument nécessaires. Le remplacement par des méthodes *in silico*, *in vitro*, ou l'utilisation des animaux de plus faible sensibilité ou éventuellement par la recherche sur l'homme n'est pas possible à ce jour. Même si les modèles comportementaux existent chez les animaux de plus faible sensibilité, ils ne sont pas adaptés à notre étude, du fait de l'absence de la structure de cerveau concerné dans notre étude. 2) Notre projet nécessite un système de marquage permanent. Pour des raisons techniques, cela demande l'utilisation d'un modèle transgénique. A ce jour, la souris est le seul mammifère pour lequel le génome est facilement modifiable, un critère essentiel pour le développement du modèle utilisé dans notre travail.

Nous avons réfléchi les expériences de façon à respecter au maximum la règle des 3Rs : remplacement (mentionné ci-dessus), réduction et raffinement. Réduction : nous avons essayé de réduire à minima le nombre d'animaux impliqués dans cette étude afin de limiter ce nombre à ceux qui sont nécessaires pour assurer l'exploitation statistique de nos résultats. Nous estimons que le nombre d'animaux requis pour la réalisation de ce projet essentiel sera de 850 animaux (pour la durée du projet sur 5 ans). Raffinement : les animaux seront hébergés de manière adaptée à leurs besoins et recevront une surveillance quotidienne et les soins adaptés. Plusieurs raffinements scientifiques sont également prévus afin de récolter un maximum de données scientifiques pour chaque souris. Le bénéfice attendu de notre projet est une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents les processus cognitifs, et, à long terme, de comprendre comment ces processus normaux peuvent être perturbés dans les conditions pathophysiologies.

9497. L'objet de cette étude est de vérifier la tolérance d'un équipement médical, porté pendant 48h et destiné à la Mesure de la pression intraoculaire (IOP) à intervalle de temps régulier.

Une IOP excessive présente un risque majeur de provoquer un glaucome.

Le glaucome affecte 67 millions de personnes dans le monde. Cette pathologie représente la seconde cause de cécité après le diabète dans les pays industrialisés. Cette pathologie affecte plus de 1% de la population de plus de 40 ans.

(Source : <http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/losp/46vision.pdf>).

Plusieurs articles rapportent que l'IOP varie sur un cycle de 24 heures. Aujourd'hui, les ophtalmologistes effectuent une mesure d'IOP ponctuellement avec un tonomètre. Il n'y a aucune information sur la variation de cette pression avec le temps, en conséquence le diagnostic est potentiellement influencé, ou le traitement n'est pas approprié ou n'est pas correctement contrôlé. D'où l'intérêt d'un équipement tel que celui prévu dans cette étude.

L'équipement présent est constitué d'une lentille de contact équipée d'un capteur, d'un générateur de signal et d'un enregistreur. Les communications entre les éléments de l'équipement se font par des liaisons sans fils. La lentille de contact ainsi réalisée est à usage humain. Elle constitue la partie sensible de cet équipement et nécessite des tests précliniques obligatoires de validation avant de pouvoir réaliser des essais cliniques. Traditionnellement, l'œil de lapin est utilisé pour évaluer les propriétés irritantes des matériaux qui entrent en contact avec le tissu oculaire (Norme NF EN ISO 9334 « Lentilles de contact ... Détermination de la biocompatibilité par évaluation de la tolérance oculaire chez le lapin »).

D'où ce projet qui a pour but d'évaluer la tolérance de la lentille de contact de ce nouvel équipement novateur pour l'ophtalmologie. La mise sur le marché d'un nouveau dispositif médical même non invasif oblige à mener une étude préclinique sur au moins une espèce animale, avant de lancer la phase d'étude clinique. Les yeux du lapin sont proches morphologiquement de l'œil humain, ce qui en fait un modèle de choix.

Le remplacement de toute utilisation d'animaux n'est pas possible, il n'y a pas d'autre alternative non-animale pour tester ce dispositif. Le dispositif prévoit de mesurer la pression intraoculaire, un modèle *in vitro* est donc inenvisageable dans ce cas.

Le nombre d'animaux finaux est établi afin de réduire au maximum le nombre total d'animaux à utiliser, suffisant de 10 lapins pour tout le projet. Concernant le raffinement des conditions de travail chez ces lapins, les procédures envisagées sont non invasives, et seront assurées par du personnel formé et expérimenté. Les lapins seront surveillés quotidiennement et des enregistrements sont prévus pour le suivi du confort des animaux. A la fin de ces procédures, la réhabilitation de ces animaux est prévue.

6498. Près de 50 millions de personnes sont atteintes par l'épilepsie. Depuis plus d'un siècle 3 générations de traitements antiépileptiques se sont succédés et ont apporté plusieurs bénéfices. Néanmoins leur efficacité reste comparable et le taux de patients sur lesquels les traitements ont peu ou pas d'effets (pharmaco-résistance) reste d'environ 30%. Par conséquent, il y a un réel besoin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'autorégulation cérébrale est un mécanisme qui maintient les débits sanguins cérébraux constants lors des variations de pression sanguine. C'est un mécanisme crucial de protection du système nerveux central, caractérisé par 2 seuils, bas et haut, de pression. Au-delà des seuils, les débits sanguins ne sont plus régulés. Il a été montré que l'autorégulation est anormale chez des patients atteints d'épilepsie et également sur des modèles de porcelets et de rats épileptiques. Plusieurs formes d'épilepsies sont donc associées à une autorégulation cérébrale anormale mais aucune étude ne montre si c'est une conséquence ou une cause. Nous proposons de démontrer que l'autorégulation cérébrale est associée aux crises d'épilepsie sur des modèles de souris épileptiques. Aucune méthode non-animale ne peut être utilisée pour étudier cette hypothèse et un modèle intégré est nécessaire.

Nous allons étudier les relations entre autorégulation et crises d'épilepsie sur 3 modèles d'induction d'épilepsie chez la souris; i) un modèle génétique d'une encéphalopathie épileptique grave, le syndrome de Dravet (souris GEFS+) ou les crises sont induites par hyperthermie, ii) un modèle d'épilepsie généralisée induite chimiquement par inhalation du gaz flurothyl sur souris sauvages, et iii) un modèle d'épilepsie du lobe temporal induit chimiquement (kaïnate). Nous étudierons également les effets du flurothyl sur un modèle de souris ayant un défaut vasculaire (souris FlnA KO). Les principaux objectifs du projet seront donc les suivants :

1) L'étude des effets des crises d'épilepsie sur l'autorégulation cérébrale de modèles de souris épileptiques ou avec défaut vasculaire. Nous mesurerons sur souris vigiles les débits sanguins cérébraux (sonde doppler ou imageur laser-speckle) et la pression artérielle (cathéter implanté) afin d'obtenir les seuils d'autorégulation ;

2) L'étude des effets de plusieurs molécules, permettant d'améliorer l'autorégulation cérébrale, sur la gravité/fréquence des crises d'épilepsie sera évaluée soit à moyen terme par imagerie soit à long terme par électro-corticogramme.

Les souris sauvages, hétérozygotes GEFS+, et FlnA KO seront reproduites sur place. Nous avons diminué le nombre de souris utilisées en répétant les mesures sur le même animal au lieu de comparer des lots, et en optimisant les lots contrôles qui ont été regroupés. Nous utiliserons un total de 477 souris sur 3 ans pour réaliser ce projet. Les crises d'épilepsie ne sont pas douloureuses comme chez les humains, l'impact sur les animaux est donc faible.

Les perspectives de ce travail sont la mise en évidence d'un mécanisme complètement nouveau impliqué dans l'épileptogénèse et la possibilité d'utiliser de nouvelles classes de médicaments, ciblant le système vasculaire, afin de pouvoir éventuellement traiter certains patients pharmacorésistant.

6499. Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, l'implication des astrocytes et de leurs interactions avec les neurones dans le contrôle des fonctions cérébrales dans un contexte normal ou pathologique reste très peu connu. Tel est précisément le but de ce projet.

Pour accéder à l'activité des astrocytes et des neurones, nous travaillerons chez la souris. Ce projet vise à étudier des aspects comportementaux et impliquant la compréhension du fonctionnement de plusieurs aires cérébrales qui ne peuvent être étudié que chez l'animal entier. Il n'est en effet actuellement pas possible de remplacer les enregistrements du cerveau intact par des simulations ou par des cultures de cellules du cerveau.

Sur les 2 années de ce projet nous utiliserons 80 souris. Nous effectuerons notamment des enregistrements chroniques des activités neuronales et astrocytaires chez l'animal éveillé. Cette chronicité implique un suivi et donc leur observation à divers stades, ce qui permettra de réduire leur effectif tout en minimisant la variabilité inter-animaux.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante: (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes, et utiliserons anesthésie et analgésie avant chaque procédure chirurgicale de façon adaptée au poids de l'animal. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3) Ce projet de recherche implique neurophysiologie et neurosciences comportementales et nécessite des interventions intracérébrales qui ne peuvent se faire que chez l'animal, ainsi que l'étude de rythmes cérébraux et de comportements déjà bien caractérisés chez la souris. Le suivi longitudinal des animaux opérés permet de réduire le nombre de souris utilisées.

6500. L'Homme est exposé à des milliers de micro-constituants provenant de son alimentation. Certains peuvent avoir des effets bénéfiques, d'autres être délétères pour la santé. Certains sont présents naturellement dans les aliments, d'autres résultent d'une intervention humaine lors de la production de l'aliment. L'étude de la complexité des expositions alimentaires et sa mise en relation avec les paramètres santé dans des études épidémiologiques ou des interventions nutritionnelles contrôlées chez l'homme nécessite une meilleure capacité d'analyse des micro-constituants alimentaires et de leurs métabolites dans les fluides biologiques. De nouvelles perspectives se sont développées grâce à l'approche métabolomique basée sur la spectrométrie de masse haute résolution, qui permet de détecter des milliers de métabolites au cours d'une même analyse. La difficulté est aujourd'hui d'identifier l'ensemble des signaux détectés dans les profils métabolomiques. Une des limites est notre méconnaissance du métabolisme intestinal, hépatique et microbien des micro-constituants alimentaires pour pouvoir les retrouver dans les profils analysés. Les micro-constituants sont si nombreux qu'il paraît irréaliste de vouloir étudier de manière systématique leur métabolisme chez l'homme. Les études sur modèles animaux nécessiteraient un très grand nombre d'animaux. Une approche alternative se développe avec la prédiction *in silico*, capable de prédire le métabolisme de n'importe quelle molécule à partir de sa structure chimique et de la connaissance des réactions de biotransformations possibles. Cette approche *in silico* a été développée et validée pour les médicaments, mais n'a pas été adaptée aux molécules d'origine alimentaire. Nous souhaitons participer à l'amélioration des capacités de prédiction des outils *in silico*, en fournissant des données observées *in vivo* sur le modèle rat pour des micro-constituants alimentaires. Il est prévu que les résultats des prédictions *in silico* soient compilés et rendus accessibles à tous dans des bases de données sur internet.

La stratégie envisagée est de compléter des rats avec une sélection de molécules pures, représentant une large gamme de structures chimiques, de collecter les urines et les plasmas des animaux et de les analyser par spectrométrie de masse haute résolution pour identifier les métabolites produits, pour ensuite les comparer aux métabolites prédits par les outils *in silico*. Par des processus dits de « machine learning », les outils de prédiction s'amélioreront progressivement avec l'intégration de données expérimentales pour une variété de structures chimiques.

Le protocole présenté consiste à compléter le régime des rats successivement avec une molécule isolée à chaque fois, à récolter les urines avant et après supplémentation, puis à compléter le régime des rats avec un mélange de 5 molécules pour collecter un échantillon de sang avant l'euthanasie des animaux. Au total 160 animaux seront nécessaires pour tester 100 molécules.

Chaque lot de rats sera constitué de 8 mâles et 8 femelles qui après adaptation pendant 9 jours à un régime semi-synthétique témoin, seront nourris pendant 5 jours avec un régime supplémenté avec une molécule pure à une dose représentant un niveau d'exposition de type nutritionnel et non pharmaceutique (0.2% du régime au maximum). Dans le cas de molécules potentiellement toxiques telles que des pesticides, la dose sera calculée de manière à rester largement inférieure à la NOAEL (dose sans effet nocif observé) de la molécule en question. Occasionnellement une molécule pourra être testée dans sa matrice alimentaire. Dans ce cas le régime sera supplémenté avec un aliment lyophilisé, à la dose de 15% du régime. De manière exceptionnelle (pesticides, molécule très chère) une procédure de gavage des animaux pourra être utilisée. Après collecte des urines aux jours 4 et 5, les mêmes rats seront remis pendant une période minimum de 9 jours sur un régime semi-synthétique témoin avant de pouvoir recevoir à nouveau pendant 5 jours un régime supplémenté avec une autre molécule choisie. Ainsi 10 molécules pures seront successivement testées sur chaque lot de 16 animaux.

Chaque animal sera observé quotidiennement pour détecter tout signe de stress (état physiologique général, comportement de prostration, perte d'appétence). Des mesures appropriées seront prises le cas échéant : exclusion temporaire ou définitive de l'animal

du protocole, exclusion de la molécule testée ou diminution de la dose testée. Après 8 jours de régime standard, puis après 4 jours et après 5 jours de supplémentation avec chaque molécule, les urines seront récoltées de la manière suivante : les rats seront placés individuellement dans une cage grillagée propre, au-dessus d'un plateau propre permettant de recueillir les urines, pendant environ 30 minutes (le temps nécessaire pour que l'animal urine). Dès que le rat aura produit de l'urine il sera remis dans sa cage habituelle. L'objectif est de déterminer la nature des métabolites urinaires, et non leur cinétique d'apparition et d'élimination. Le recueil d'un spot urinaire est donc suffisant. Afin d'obtenir une plus grande quantité d'urine le protocole de collecte est réalisé au jour 4 et au jour 5 de la supplémentation. De manière exceptionnelle et pour obtenir plus de précision sur la pharmacocinétique pour les molécules potentiellement toxiques telles que les pesticides, les recueils urinaires se feront en cages métaboliques sur 72h après le gavage.

En fin de protocole, chaque lot de 16 animaux sera divisé en 3 (deux lots de 6 et un lot de 4) pour la procédure finale. Chaque lot de 6 animaux (3 mâles, 3 femelles) recevra pendant 5 jours un mélange de 5 molécules (2 mélanges testés en parallèle). Les quatre animaux restant (2 mâles, 2 femelles) recevront le régime standard non supplémenté.

Le nombre d'animaux est suffisant pour les analyses qualitatives envisagées des profils métaboliques. Les prélèvements d'urine réalisés précédemment pour chacune des molécules testées individuellement permettront de faciliter l'interprétation des profils analytiques des plasmas, sachant que les métabolites circulants sont généralement aussi retrouvés dans les urines. Ce projet d'expérimentation animale sera réalisé dans le strict respect de la règle 3Rs, dans sa conception comme dans sa réalisation.

6501. Quand l'organisme rencontre un microbe, il met en place une réponse pour se défendre : la réponse immunitaire. Cette réponse fait rentrer en jeu des cellules spécialisées, les lymphocytes, qui vont se multiplier et combattre le pathogène. Parmi les lymphocytes, il y a des lymphocytes tueurs qui vont combattre directement le pathogène, et qui ont besoin de recevoir des signaux d'aide de lymphocytes coordinateurs. Dans certaines maladies telles que des infections virales, il arrive que les signaux d'aide soient absents. Dans ces conditions les lymphocytes tueurs vont éliminer le pathogène une première fois mais ne seront pas capables de le combattre à nouveau s'il y a une réinfection : on parle alors de "mémoire immunitaire" défaillante.

Le but de notre projet est de travailler sur ces mécanismes d'aide, indispensables à une bonne mémoire immunitaire. Nous voulons mieux connaître les cellules impliquées dans ces mécanismes. Nous allons donc utiliser le modèle animal de la souris. Le système immunitaire de la souris est très proche de celui de l'homme. Nous utiliserons des souches de souris transgéniques, dans lesquelles nous pouvons supprimer de manière ciblée les lymphocytes dont nous souhaitons étudier le rôle.

Les lymphocytes tueurs "naïfs", c'est-à-dire qui n'ont jamais rencontré leur antigène, sont très rares et très difficilement détectables dans l'organisme. Pour faciliter la détection, les souris recevront une injection de lymphocytes tueurs spécifiques d'un antigène bactérien et seront ensuite infectées par la bactérie. Cette technique va nous permettre d'avoir une réponse immunitaire détectable très précocement. L'intérêt de ce projet est de comprendre les anomalies du système immunitaire que l'on observe lors d'infections virales (Sida, hépatite) ou de cancers. Dans ces maladies, les lymphocytes tueurs ne jouent pas leur rôle d'élimination du virus, de la bactérie ou de la cellule cancéreuse. Le plus souvent il s'agit d'une anomalie des signaux d'aide. Comprendre précisément quels signaux interviennent, à quel moment, pourra dans le futur permettre de développer des médicaments ciblant très précisément les bonnes cellules et les bonnes molécules, afin de rétablir le contrôle des microbes ou des cellules cancéreuses.

Pour ce projet nous avons besoin d'étudier la réponse des lymphocytes tueurs chez des souris infectées par une bactérie. Dans certaines souris, nous allons supprimer les lymphocytes coordinateurs qui fournissent de l'aide, en injectant aux souris des produits. Dans d'autres souris, nous rajouterons des lymphocytes coordinateurs. Au total, le nombre de souris utilisées sera de 710.

Dans ce projet nous avons absolument besoin de réaliser des expériences dans un modèle animal : en effet la réponse immunitaire est un phénomène complexe qui implique plusieurs cellules, dans des environnements biologiques et anatomiques bien définis, et des phénomènes de migration et d'interaction. Il est impossible de reproduire *in vitro* l'ensemble de ce phénomène. C'est pourquoi l'utilisation d'un organisme vivant est requise.

Afin de limiter le stress des souris, elles sont manipulées par petits groupes de 5 individus au maximum. Le milieu est enrichi par l'ajout de cabanes dans les cages. En plus de la sciure, les souris disposent de lamelles de papier découpé afin de se faire des nids et des cachettes. La procédure d'injection est réalisée sur des animaux anesthésiés par isoflurane, gaz anesthésique qui permet une anesthésie transitoire et rapide.

La majorité du projet est réalisée chez des souris C57BL6/J WT. Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés, nous omettrons les analyses cinétiques du phénotype chez les souches transgéniques, et ne réaliserons dans ces souches de souris que les expériences clés (analyse de l'efficacité des lymphocytes tueurs au jour 4 post-infection, et au jour 4 après ré-infection au stade mémoire). Un calcul de puissance a été réalisé afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaire à ce projet.

6502. L'ensemble de ces expérimentations s'inscrit dans la formation d'étudiants ingénieurs en génie biologique de second cycle. L'objectif de ces études est de compléter les cours détaillés sur les grands principes de régulation des fonctions physiologiques avec le concept de régulation *in vivo* et plus précisément sur la transformation d'énergie chimique en énergie mécanique. A l'issue de cet enseignement, l'étudiant sera donc capable de définir les principaux mécanismes physiologiques et de dialoguer avec les acteurs du monde médical. Il est essentiel de former ces futurs ingénieurs en génie biologique aux tests en conditions réelles sur animal vivant et à l'observation de gestes techniques non simulés comme la pose d'électrodes ou de capteur de force, afin de les préparer et les rendre plus performant dans leurs futurs domaines de compétence. Cette formation a également pour but de confronter les étudiants à l'expérimentation animale et de les sensibiliser au bien-être animal et plus particulièrement sur la notion des 3 R (réduction, remplacement, raffinement)

Dans le cadre de ces travaux pratiques ces 3 notions ont servi de piliers pour construire cette procédure la plus éthiquement possible.

### (1) Réduction

Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au plus faible possible (Réduction) tout en permettant à chaque participant de pouvoir réaliser dans de bonnes conditions les techniques expérimentales sous le contrôle d'un enseignant formé à l'expérimentation animale. Soit 1 rat par séance (pour l'ensemble des étudiants) à raison de 4 séances par an pour un total de 4 rats par année et 20 rats pour les 5 années du projet.

### (2) Remplacement

Les méthodes alternatives (remplacement) comme les vidéos ou modèles numériques ont servi de support pour les cours mais ne permettent pas de former les étudiants à certains gestes techniques comme l'anesthésie c'est pourquoi il est essentiel de les former aux conditions réelles et non simulées.

### (3) Raffinement

Les animaux sont commandés une semaine avant le début des travaux pratiques. Dès leurs réceptions les rats sont examinés puis stabulés en cages ventilées avec un environnement enrichi (papier cardé) et une visite quotidienne est effectuée afin de garantir leur bien-être. Le jour précédant l'expérimentation, les animaux sont mis à jeun. Le jour de l'expérimentation, un l'enseignant ou un personnel qualifié, isole les rats puis les anesthésie individuellement par une injection intra-péritonéale d'un mélange de xylozine-kétamine (10 mg/kg et 80 mg/kg) associé à un opioïde buprénorphine en sous cutanée pour renforcer l'analgésie. Une fois l'anesthésie profonde constatée les animaux sont amenés en salle de TP où l'enseignant effectuera une chirurgie de la patte afin de placer les électrodes de stimulation sur le nerf sciatique et un capteur de force sur un des tendons d'un muscle de la patte. Les étudiants pourront alors expérimenter l'impact de différentes stimulations sur le raccourcissement du muscle mis en évidence par le capteur de force. Pendant tout la durée de l'expérimentation l'enseignant veillera au maintien de l'anesthésie par des doses de maintien à intervalles réguliers (toutes les 30 minutes) mais également au bon déroulement de l'expérimentation.

6503. Le présent protocole s'inscrit dans un projet ayant pour objectif le développement de composés actifs pour la prévention et le traitement de l'obésité sarcopénique et l'immobilisation. Il n'a pas encore été mis au point de traitement efficace contre cette pathologie.

La sarcopénie est une pathologie qui touche principalement les personnes âgées ou en arrêt d'activité motrice (immobilisation) et se caractérise par une perte accélérée de la masse et donc de la force musculaire.

Chez les personnes âgées en surpoids, les cellules musculaires peuvent être infiltrées par des cellules adipeuses favorisant ainsi l'accumulation de lipides dans le muscle et la perte de fonctionnalité des muscles. On parle alors d'obésité sarcopénique.

La 20-hydroxyecdysone est une phytoecdysone (famille de stéroïdes extraits de plantes). Cette molécule semble limiter l'accumulation de la masse grasse et renforcer la masse maigre par un mécanisme partiellement décrit, impliquant probablement une limitation de la captation des acides gras dans le tissu adipeux, une augmentation de l'oxydation des acides gras dans le muscle et une stimulation de la synthèse protéique musculaire. Ces propriétés de la 20-hydroxyecdysone (appelée ici 20E ou BIO101) permettent d'envisager son utilisation, ainsi que l'utilisation d'un de ses dérivés (BIO103) en tant que médicaments susceptibles de prévenir l'établissement ou l'aggravation de l'obésité sarcopénique.

Il n'est pas possible de mimer l'effet d'une molécule sur la morphologie des muscles au niveau cellulaire *in vitro*, ce qui oblige de réaliser notre étude chez l'animal entier.

Nous étudierons 250 souris au total, car il n'est pas possible de réaliser cette étude sur des cellules. Leur nombre a été calculé au plus juste en fonction de l'analyse statistique. Le nombre est justifié par le fait qu'il faut un effectif suffisant dans chaque groupe afin qu'on puisse tester si des différences significatives existent entre les groupes, du fait de la variabilité attendue des paramètres mesurés. Nous avons fixé le nombre de souris à 10 par groupe, ce nombre a été déterminé lors de nos précédentes investigations. Il prend en compte la variabilité interindividuelle et le fait que nous testons des effets nutritionnels.

Le comportement normal (toiletage, repos, alimentation dans la cage, interaction avec le congénère) et anormal (déplacement incessant lors de la phase diurne, immobilité) dans la cage et l'aspect visuel de la souris est évalué tous les jours par le personnel de l'animalerie. Les animaux sont pesés chaque semaine afin d'identifier une perte de poids corporelle. En cas de perte de poids importante (> 20%) la souris est euthanasiée. Le critère de perte de poids sera complété par l'observation du comportement des animaux. Une diminution de l'activité motrice et une faiblesse d'un animal entraînera sa sortie du protocole et son euthanasie.

Le milieu dans lequel est élevé les souris est enrichi et toutes les mesures sont prises afin d'éviter leur souffrance. S'agissant de l'enrichissement, toutes les cages de cette étude seront garnies de cellulose (litière douce) avec une maisonnette en carton afin de limiter au maximum les agressions.

6504. L'amélioration des traitements de maladies dues aux mycobactéries fait l'objet de recherches actives car certaines mycobactéries sont responsables de maladies graves, la plus connue étant la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Cependant, d'autres maladies telle la lèpre (due à *Mycobacterium leprae*) ou l'ulcère de Buruli (due à *Mycobacterium ulcerans*) sont tout aussi invalidantes mais restent méconnues. Les traitements de certaines mycobactéries sont longs et l'observance par les patients est difficile à vérifier par le personnel soignant du fait de l'éloignement des centres de soins dans les régions d'endémie (Afrique principalement).

Dans le cas de la lèpre, le traitement recommandé par l'OMS depuis 1982 consiste en une polychimiothérapie à base de rifampicine, clofazimine et dapsone. Il dure de 12 à 24 mois en fonction du cas clinique de la maladie. La mauvaise observance de la prise d'antibiotiques a entraîné une sélection de souches résistantes aux molécules utilisées dans les traitements actuels.

La problématique dans le cadre du traitement de la lèpre est donc la durée de traitement mais aussi la possibilité d'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques due à une mauvaise observance du traitement par les patients. Il est donc nécessaire de trouver

des antibiotiques permettant 1. de réduire la durée de traitement ; 2. de réduire la fréquence d'administration des antibiotiques et 3. d'élargir le panel d'antibiotiques utilisables en cas de bactérie résistante à un des antibiotiques utilisés dans le traitement standard.

La mise sur le marché de nouveaux antibiotiques demeure assez rare de nos jours. Récemment, de nouvelles molécules ont cependant démontré *in vitro* des activités sur des infections respiratoire ou cutanée (exemple de la Solithromycine (famille des macrolides) ou du Tédizolide (famille des oxazolidinones). Les résultats d'activité de ces molécules étant encourageants, il est nécessaire d'évaluer celles-ci dans le cadre de maladies telles que la lèpre. Notre projet consiste donc en l'étude *in vivo* de nouvelles molécules sur cette pathologie selon un schéma expérimental défini.

L'agent responsable de la lèpre (*M. leprae*) n'est pas cultivable *in vitro* et se développe *in vivo* de manière très longue (environ 12 mois). Le modèle animal ne peut être donc remplacé pour l'étude de cette bactérie. Nous utiliserons pour notre étude l'inoculation de la bactérie dans le coussinet plantaire de la souris. Le schéma expérimental utilisé dans l'évaluation d'une nouvelle molécule est celui de la méthode dite de « bactéricidie proportionnelle » : 3 dilutions de bactéries différentes sont inoculées à l'animal (10 animaux par dilution) ce qui permet de mesurer l'activité bactéricide d'une molécule par rapport à l'absence de traitement et à un antibiotique de référence. Au total, 30 animaux sont nécessaires pour une molécule à une concentration.

Par an, au maximum, 5 nouvelles molécules seront testées en fonction des recherches menées sur les nouveaux antibiotiques (=150 animaux). Deux posologies par molécule seront testées afin d'adapter au mieux l'extrapolation du traitement à la médecine humaine par la suite (= 300 animaux). Afin de démontrer que la bactérie s'est bien multipliée et que l'effet bactéricide n'est pas dû à un problème avec la souche bactérienne, un groupe témoin non traité est nécessaire. Celui-ci sera inoculé avec 4 dilutions d'inoculum afin d'affiner au maximum les résultats de croissance bactérienne (= 40 animaux). Afin de démontrer l'activité bactéricide d'une nouvelle molécule, il est nécessaire de comparer celle-ci avec un groupe traité par un antibiotique connu pour son action contre *M. leprae* (= 30 animaux). Au total, pour tester l'efficacité de 5 nouvelles molécules, 370 souris sont nécessaires sur un an. Sur 5 ans, le nombre total maximal d'animaux nécessaires à cette étude est donc porté à 1850 souris.

L'évolution de la maladie n'entraîne aucune souffrance ni décès chez l'animal. Cependant, les expériences étant longues (au minimum 12 mois), il est nécessaire de prendre en compte un taux de mortalité de 30% correspondant au vieillissement normal des animaux et aux problèmes techniques pouvant être rencontrés lors du maintien en stabulation des animaux (conflit entre animaux, biberon bouché, geste technique lors du traitement) et ce afin de maintenir une puissance statistique suffisante lors de l'analyse des résultats. Le nombre maximum total d'animaux sur 5 ans est donc de 2405.

Pour établir nos procédures, en plus d'une bibliographie approfondie sur le sujet, nous avons pris en compte la règle de 3R :

- Remplacement : *Mycobacterium leprae* n'étant pas cultivable *in vitro*, le modèle murin est le seul permettant une évaluation de l'activité des antibiotiques avant un essai chez l'homme. Il est dans ce cas impossible de remplacer l'expérience sur l'animal par une expérience *in vitro* ;

- Réduction : le nombre d'animaux proposé a été réduit au minimum indispensable nous permettant de répondre à la question posée après évaluation statistique et incluant le vieillissement normal des souris ;

- Raffinement : l'évolution de la maladie qui n'engendre aucune souffrance chez l'animal et l'enrichissement utilisé, permettent de limiter le stress des animaux utilisés.

6505. Les différents tissus de l'organisme sont approvisionnés en sang par les artères. Plus on s'éloigne du cœur, plus le calibre de ces artères est réduit. Les petites artères périphériques, ou artères de résistance, comme les artères de la peau, ont la capacité de se contracter afin de contrôler la répartition du flux sanguin dans les différents organes de l'organisme. Le niveau de contraction de ces artères est sous le contrôle de différents éléments, dont des nerfs innervant ces artères. Ces nerfs appartiennent au système nerveux sympathique, qui est impliqué dans toutes les réactions au stress non conscientes (accélération du rythme cardiaque par exemple).

Nous avons mis en évidence chez la souris que 1) l'Ephrine-A4 est une protéine exprimée par les artères de résistance à partir du jour post-natal 2 (P2) et chez l'adulte 2) le récepteur EPHA4 est exprimé par les neurones sympathiques innervant les artères de résistance également de P2 à l'âge adulte. Les souris chez lesquelles le récepteur EPHA4 a été génétiquement inactivé spécifiquement dans les neurones sympathiques présentent une plus grande densité de nerfs autour des artères qu'une souris sauvage. Cette augmentation de l'innervation artérielle est associée à une augmentation de la résistance vasculaire et à une vasoconstriction plus efficace. La pression artérielle étant directement liée à la résistance vasculaire, nous avons émis l'hypothèse que ces animaux pourraient présenter une hypertension artérielle, au moins dans les situations stressantes. Cette hypothèse est actuellement en cours d'investigation.

Nous nous intéressons également à l'innervation des artères de plus gros calibre, comme l'aorte, et nous avons identifié la neuropiline-1 (NRP1), exprimée par les neurones sympathiques, comme une molécule candidate impliquée dans la régulation de l'innervation sympathique des artères de gros calibre. Nous souhaitons valider le rôle de la NRP1 dans la régulation de l'innervation sympathique des artères de gros calibre, et étudier les conséquences anatomiques et fonctionnelles de la perte de cette protéine.

Notre but est ici d'étudier l'innervation sympathique, aussi bien sur les artères périphériques de résistance que sur les artères tronculaires de gros calibre, avec des souris chez lesquelles ont été génétiquement inactivés respectivement les récepteurs EPHA4 et NRP1 spécifiquement dans les neurones sympathiques.

Mieux comprendre la mise en place et le maintien de l'innervation sympathique des vaisseaux permettra de mieux comprendre l'origine de certaines affections ainsi que leurs conséquences (hypertension artérielle, ischémie diabétique, infarctus...), et ainsi de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

L'espèce animale utilisée est la souris. Nous avons choisi la souris car ce modèle présente un bon compromis entre la proximité physiologique avec l'Homme et la facilité de manipulation génétique.

Le nombre d'animaux total requis pour ce projet est 580 animaux, répartis en 180 animaux âgés de moins de 15 jours, 180 animaux adultes et 20 souris gestantes mettant bas 200 souriceaux.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3R :

**Remplacement** : nous avons réalisé le maximum d'expérimentation *in vitro* avant de passer à l'expérimentation sur l'animal. Ce projet visant à étudier l'effet de la suppression *in vivo* de 2 protéines, il n'est pas possible dans ce cas de s'affranchir de l'expérimentation animale.

**Réduction** : le nombre d'animaux utilisés correspond au minimum nécessaire pour obtenir un résultat scientifique valide.

**Raffinement** : les souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi en coton de nidification ; tout animal présentant des signes de douleur ou de dégradation de l'état général sera exclu de la procédure en cours. Les animaux sont surveillés tous les jours par les animaliers ou les expérimentateurs, qui possèdent chacun une grille de notation de l'état général et du bien-être de l'animal. Tout signe de mal-être ou de souffrance (yeux mi-clos, dos creusé, poil hirsute, absence de toilettage, amaigrissement, absence de réaction aux stimuli extérieurs) entraînera l'exclusion de l'animal de la procédure, ou son euthanasie.

6506. Le but de ce projet est l'évaluation de l'effet thérapeutique d'un inhibiteur de la demethylase LSD1 sur le développement de la cardiomyopathie dilatée (CMD) dans le cadre du syndrome d'Emery Dreifuss liée à des mutations d'un gène codant une protéine de l'enveloppe nucléaire.

Le syndrome d'Emery Dreifuss est caractérisé par une progression lente de la perte de la force et de la masse des muscles squelettiques accompagné du développement d'une dilatation du ventricule gauche du cœur qui conduit à l'insuffisance cardiaque.

L'espèce animale utilisée pour ce projet est la souris *Mus musculus*. En effet, afin d'étudier la physiopathologie de la CMD nous avons créé un modèle murin par transgénèse ciblée porteur d'une mutation décrite chez l'homme. Ce modèle murin récapitule à l'état homozygote les caractéristiques phénotypiques de cette pathologie. Les premiers symptômes sont détectés dès 3 mois chez les mâles homozygotes et évoluent rapidement jusqu'à la mort des animaux provoquée par l'aggravation du phénotype cardiaque. Par conséquent ce modèle constitue le modèle de référence pour tester l'administration de molécules à visées thérapeutiques à fin de déterminer leur effets sur la progression du phénotype cardiaque ce contexte de cette pathologie.

Nous avons démontré que les premiers symptômes de la CMD dans notre modèle murin étaient présents chez l'embryon, puis étaient compensés à la naissance des souris. Ces souris développent ensuite un CMD autour de 4-6 mois. L'apparition des symptômes embryonnaires sont liés à des modifications de la régulation de l'expression du patrimoine génétique (modifications épigénétiques). Nous posons comme hypothèse que ces modifications épigénétiques peuvent être contrecarrées par l'utilisation d'un composé pharmacologique, l'inhibiteur de la demethylase LSD1, déjà utilisé dans le cadre de certain cancer. Pour démontrer cette hypothèse nous allons traiter de femelles gestantes, des souris néo-natales et adultes avec cet inhibiteur et évaluer son impact sur les embryons.

Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est 112. Le plan expérimental est déterminé à l'aide du module IPSUR du logiciel R. Ce modèle permet de déterminer le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'expérimentation tout en ayant suffisamment de données expérimentales pour appliquer les tests statistiques nécessaires à l'analyse des données.

Afin de minimiser les interventions sur les animaux au cours du traitement, l'administration de l'inhibiteur sera effectuée par injection intrapéritonéale (piqûre au niveau du ventre) ou gavage.

La méthode d'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction cardiaque est non invasive et nécessite uniquement une anesthésie légère.

Les souris sont stabulées sur des portoirs ventilés avec un système d'abreuvement automatique et nourriture à volonté. Le nombre de souris par cage est fixé à 1 souris pour 80 cm<sup>2</sup>. Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (les lumières s'allument automatiquement à 6h du matin et s'éteignent le soir à 18h). Le milieu est enrichi avec du coton compacté prédécoupés pour la nidification des souris. Des igloos (maisonnettes) en polypropylène sont disposés dans les cages permettant les jeux et le repos des souris.

6507. L'hormone glucocorticoïde (GC) libérée en réponse au stress régule diverses fonctions biologiques importantes (comportement, système immunitaire, métabolisme...) via l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) - exprimé dans tous les types cellulaires.

Plusieurs études ont montré un taux significativement élevé de cortisol chez des patients souffrant de la maladie de Parkinson ou de la maladie d'Alzheimer ce qui suggère l'implication de GC-GR dans la pathogenèse de ces maladies neurodégénératives.

Notre projet de recherche vise à étudier les mécanismes par lesquels cette hormone, via le GR, agit dans le développement et la progression de la maladie de Parkinson (MP) et la maladie d'Alzheimer (MA). Ce projet concerne aussi le rôle du GC-GR dans le stress environnemental qui peut exacerber la neurodégénérescence. Dans nos lignées de souris, (invalidées pour le GR dans différents types cellulaires), nous effectuerons un stress chronique modéré imprévisible, connu pour perturber non seulement l'axe Hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) mais aussi les fonctions neuronale et immunitaire. L'effet du stress sera étudié dans un contexte pathologique c.a.d. dans des modèles expérimentaux de la MP ou de la MA. Pour comprendre le rôle précis du GR, nous utilisons des lignées de souris dans lesquels le GR est inactivé dans un type cellulaire qui permet d'appréhender les effets protecteurs ou néfastes du stress et du GR dans la physiopathologie de MP ou MA. Dans ce contexte, nous étudierons aussi le rôle du Toll-Like récepteur 9 (TLR9- un récepteur immunitaire dont l'activation déclenche une réaction inflammatoire) en utilisant des souris invalidées pour le TLR9 (TLR9KO) ou pour la Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2), dont les deux sont régulés par GR.

Au cours de ce projet, qui durera cinq ans, nous effectuerons des études comportementales, neuropathologiques, neuroendocrines et moléculaires/cellulaires qui nécessiteront l'utilisation de 1175 souris total (les souris C57BL/6J, les souris TLR9KO et les souris conditionnelles du GR ou LRRK2 de fond génétique souche C57BL/6J). Cela permettra d'obtenir une vision intégrée de l'effet du traitement ou de l'invalidation et en tenant compte de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. En effet, ce nombre et les protocoles tiennent compte de la règle 3R, c.a.d. Remplacement : La nature expérimentale de notre recherche requiert l'utilisation



de modèles animaux. Réduction: le nombre minimum mais suffisant animaux par génotype ou par traitement dans le but d'obtenir des résultats fiables et exploitables ; Raffinement : dans le respect du bien-être de l'animal. Les animaux feront l'objet d'un contrôle quotidien par l'expérimentateur compétent afin de d'éviter une souffrance. Néanmoins, nous utiliserons aussi, pour les études moléculaires, des cultures cellulaires pour limiter le nombre d'animaux utilisés.

6508. L'œdème maculaire est une cause majeure de déficience visuelle qui intervient au cours de nombreuses pathologies rétinienne : rétinopathie diabétique (RD), dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), inflammations intraoculaires (uvéites) ou occlusions veineuses. De forte dose de glucocorticoïdes sont utilisées en injection intra-oculaire pour traiter l'œdème d'origine non seulement inflammatoire (uvéites) mais aussi vasculaire (occlusions veineuses) avec un effet relativement court accompagner parfois d'effets secondaires sévères (glaucome, cataracte). Les anti-VEGF neutralisant le facteur de croissance VEGF sont utilisés pour traiter la forme néovasculaire de la DMLA, ils ont un effet démontré sur l'exsudation, mais peu d'effets sur les néovaisseaux et avec comme principal inconvénient la nécessité de réinjection intraoculaire mensuelle, exposant à un risque d'infection endoculaire.

L'œdème rétinien est la conséquence de la perturbation de l'homéostasie hydro-ionique de la rétine (rupture des barrières hémato-rétiniennes et/ou dérégulation des mécanismes de drainage des fluides via cellules gliales de Müller (CGM), épithélium pigmentaire et choroïde). Les mécanismes moléculaires qui contrôlent les mouvements hydro-ioniques dans la rétine restent mal connus.

Le récepteur minéralocorticoïde (MR) est exprimé non seulement dans le rein où il est impliqué dans la régulation des canaux/pompes ioniques contribuant à la réabsorption du sodium et le maintien de la pression artérielle, mais aussi dans le cœur, les vaisseaux, les tissus adipeux etc. Une activation chronique excessive du MR a été liée à l'inflammation, le stress oxydant et la prolifération fibreuse en pathologies cardio-vasculaires et rénales. Le MR est aussi exprimé dans la rétine. Nous avons montré chez le rat que son activation induit un œdème de la rétine et une dilatation et perméabilisation des vaisseaux choroïdiens via activation et modification de localisation des canaux ioniques dans les CGM et les cellules endothéliales vasculaires. Notre hypothèse est qu'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 qui perturbent l'homéostasie du fluide dans la rétine. L'objectif de cette étude est donc d'identifier le rôle du MR dans l'œdème rétinien et de proposer éventuellement de nouveaux traitements par l'antagoniste du MR.

C'est une étude translationnelle qui nous permettrait non seulement de mieux comprendre la physiopathologie des maladies rétinienne œdémateuse, mais aussi de développer de nouveaux traitements alternatifs ou complémentaires de ceux qui existent déjà en clinique. L'utilisation de l'animal entier ne peut pas être remplacée, car nécessaire pour apprécier les mécanismes physiopathologiques intégrés. Les modèles de néovascularisation choroïdienne (CNV, 384 rats et 360 souris), d'uvéite auto-immune (EAU, 144 rats), d'uvéite induite par endotoxine (EIU 96 souris) et de diabète de type 2 (96 rats) et de type 1 (216 souris) seront utilisés. 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 sont 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.

6509. Depuis 3 ans, nous étudions en milieu naturel l'effet d'un gradient d'urbanisation (couverture végétale au sol, disponibilité alimentaire, exposition aux polluants sont différents suivant les sites) sur des paramètres physiologiques et moléculaires chez une espèce sentinelle, la Mésange charbonnière (*Parus Major*). Les paramètres physiologiques tels que le stress oxydant, le taux d'érosion des télomères et l'efficacité du système immunitaire sont cruciaux comme traits d'histoires de vie majeurs intimement liés à la santé des individus, à savoir la longévité et la reproduction. Il s'avère difficile en milieu naturel de distinguer les effets des facteurs urbains sur les paramètres physiologiques et moléculaires. C'est pour cette raison que nous voudrions mener une étude écotoxicologique en laboratoire chez un oiseau, le Diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*), et donc en milieu contrôlé durant laquelle nous allons administrer des quantités contrôlées de polluants bien déterminés alors que tous les autres paramètres (nourriture, dérangement, parasites, etc...) ne varient pas. Ces polluants seront solubles dans l'eau. Nous proposons 2 expérimentations qui seront réalisées dans les 3 ans à venir.

Le projet de recherche proposé a pour but :

1) un suivi des paramètres physiologiques : nous voulons évaluer si un cocktail de différents polluants utilisés en synergie sont responsables d'une plus grande production de radicaux libres, ce qui peut provoquer un stress oxydant et une érosion des télomères. Un prélèvement sanguin dans la veine alaire à l'aide d'un capillaire (100 µl) avant et après traitement permettra d'effectuer ces analyses physiologiques chez les adultes pour les expériences 1 et chez les parents et les poussins pour l'expérience 2.

2) d'évaluer la bioaccumulation de ces polluants dans les tissus des diamants mandarins. La mesure de la concentration des polluants administrés dans l'eau de boisson, à des doses similaires à celles mesurées en milieu urbain/zone polluée, se fera sur : 5 plumes de mue après le début du traitement, les lipides de la glande uropygienne prélevés à l'aide d'un capillaire, les fèces et les œufs pondus (stériles pour l'expérience 1 puisque les oiseaux mâles et femelles seront séparés) et un œuf fertile pour l'expérience 2. Ceci permettra le suivi du transfert des polluants dans le « vivant » et les conséquences physiologiques chez cette espèce aviaire.

Ce projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R. Nous allons utiliser 40 oiseaux adultes femelles et 40 oiseaux adultes mâles pour l'expérience 1. Pour l'expérience 2, nous utiliserons 40 couples (40 mâles et 40 femelles). Nous allons donc utiliser un total de 160 oiseaux adultes et 120 poussins (les poussins sont issus de la reproduction dans l'expérience 2), ce qui fait un total de 280 oiseaux pour les deux expériences.

Les expériences sur la bioaccumulation et les effets de la pollution sur la physiologie de l'oiseau ne peuvent par définition être réalisées que chez l'animal vivant (=Remplacement). Nous avons choisi d'avoir 10 oiseaux (ou couples) par groupe afin d'avoir une puissance de test statistique satisfaisante tout en réduisant le nombre d'animaux impliqués dans l'expérience (=Réduction). Enfin, pour l'enrichissement des cages nous utilisons des perchoirs et branchages et également des bassines dans lesquelles les oiseaux peuvent se baigner (=Raffinement).

6510. Il est désormais admis qu'une réponse immunitaire inadaptée au microbiote peut conduire au développement des maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. Les ILC « innate lymphoid cells » et les lymphocytes T constituent respectivement le bras inné et le bras adaptatif de la réponse immune dite « cellulaire ». Ces deux types cellulaires participent au maintien d'une coexistence saine entre le microbiote et le reste de notre organisme. Bien que les cellules T et les ILC partagent de nombreuses caractéristiques fonctionnelles et développementales, elles remplissent des rôles différents et complémentaires. Ceci suggère que ces deux lignages dialoguent en permanence afin de fournir les réponses immunes les mieux adaptées. Nos recherches se déroulent autour de deux axes principaux: d'une part les interactions entre cellules T et ILC, d'autre part l'évolution du potentiel développemental des progéniteurs des ILC au cours de la vie. Pour traiter le premier axe, nous allons étudier le rôle de la réponse T aux antigènes du microbiote dans la régulation des ILC. Pour ce faire, des souris déficientes en cellules T seront reconstituées par des procédures différentes et complémentaires. Un premier ensemble de procédures consiste à prélever des lobes thymiques sur des nouveau-nés et à les greffer sous la capsule rénale de souris déficientes en cellules T afin de reconstituer le compartiment T. Le rôle joué par le microbiote sera évalué en traitant la moitié des animaux greffés avec des antibiotiques dès la naissance. Les greffes seront réalisées sous anesthésie et des traitements analgésiques per et post-opératoires seront administrés pour réduire la douleur liée au geste chirurgical. Une troisième procédure consistera à injecter des cellules T matures à des souris déficientes en cellules T afin d'induire une réponse T dirigée contre les antigènes du microbiote.

Autour du second axe, la dernière procédure consiste à transférer des sous populations définies de progéniteurs hématopoïétiques de source fœtale ou adulte chez des animaux receveurs vides de toute population lymphocytaire. Tous les transferts adoptifs de cellules seront effectués sous anesthésie et les animaux receveurs seront traités pendant toute la durée de la procédure afin de limiter les effets adverses qui pourraient résulter de la réponse inflammatoire dirigée contre les antigènes du microbiote. Un suivi hebdomadaire du poids des animaux sera également réalisé. Ainsi, au total 1050 animaux feront l'objet d'une procédure pour la réalisation de ce projet.

L'ensemble de ces études a pour objectif d'améliorer la compréhension et la connaissance de mécanismes physiologiques qui garantissent le maintien de l'homéostasie intestinale chez l'adulte. Ces connaissances sont indispensables à la mise au point des traitements les mieux adaptés mais elles participent également à la mise en place de stratégies de prévention des maladies inflammatoires de l'intestin et de suivi des patients atteints par ces maladies.

6511. 1/ La production de sérum hémolytique permet d'obtenir des anticorps polyclonaux de lapin anti-hématies de mouton qui sont utilisés pour le diagnostic de la brucellose dans le bétail en médecine vétérinaire.

Pour cela, le test diagnostique met en présence les éventuels anticorps dirigés contre l'agent de la brucellose de l'échantillon à tester avec des antigènes de *Brucella*. La réaction de révélation utilise, entre autre, des anticorps de lapin anti hématie dont la production fait l'objet de la présente demande.

L'espèce lapin a été choisie car elle produit des anticorps anti-hématie de haute affinité qui permettent de réduire les volumes. Il n'y a pas de modèle de substitution *in vitro* performant permettant de s'affranchir de l'utilisation des anticorps animaux.

2/ Les anticorps polyclonaux anti-hématies humaines issus du sérum de lapin sont utilisés depuis plus de 30 ans dans la production du test de diagnostic *in vitro* dit de « Waaler-Rose » pour le diagnostic de maladies auto-immunes, en particulier la polyarthrite rhumatoïde:

Les anticorps de lapin, fixés sur des hématies de mouton, sont utilisés pour assurer la sensibilité et la spécificité du test de Waaler-Rose. Ils permettent l'agglutination, détectable visuellement, de ces hématies sensibilisées en présence de facteur rhumatoïde apporté par les échantillons de patients.

L'espèce lapin a été choisie pour l'homologie immunologique qu'elle possède avec les immunoglobulines humaines qui sont la cible naturelle des facteurs rhumatoïdes. La qualité des anticorps ainsi obtenus s'est révélée très satisfaisante et répond bien aux besoins en diagnostic tout en minimisant le nombre d'animaux à inclure dans les protocoles.

Les animaux sont hébergés individuellement dans des conditions conformes à la réglementation et dans une ambiance propice au bien-être des animaux (musique...).

Ils sont soignés quotidiennement par du personnel qualifié et sensibilisé au bien-être animal.

Les immunisations à réaliser dans le cadre de ce projet porteront, en fonction des besoins en tests à fournir sur une période de 5 ans, sur 360 lapins.

L'utilisation de méthode de production alternative (*in vitro*), qui correspondrait à une modification majeure du design, n'est pas viable du point de vue industriel et n'est donc pas pratiquement réalisable.

6512. L'Organisation mondiale de la santé estime que 285 millions de personnes dans le monde souffrent d'une déficience visuelle : 39 millions de personnes sont aveugles et 246 millions son malvoyantes.

En particulier, la cécité peut résulter soit d'une dégénérescence de photorécepteurs soit de la mort des cellules ganglionnaires rétiniennes qui sont chargées d'envoyer l'information visuelle au cerveau.

Même s'il est vrai qu'il existe des solutions telles que les prothèses rétinienne ou la thérapie optogénétique qui donnent grand espoir pour la restauration de la vision des patients aveugles en raison d'une dégénérescence de photorécepteurs, aucune stratégie envisageable n'a émergé pour les patients qui ont perdu les cellules ganglionnaires rétiniennes et donc le lien œil-cerveau, ou ceux qui souffrent d'une opacification cornéenne empêchant la lumière et l'image d'atteindre la rétine.

Le but du projet est, dès lors, d'étudier la faisabilité de restaurer la perception visuelle en stimulant le système visuel avec les ultrasons car ces derniers peuvent se propager dans des milieux opaques aux photons et ainsi de surmonter certaines limites de méthodes proposées antérieurement. Il a également été démontré que les ultrasons, déjà largement utilisés comme technique d'imagerie non invasive, peuvent dans certains cas stimuler l'activité des cellules neuronales.

Notre objectif est donc d'étudier si la stimulation par ultrasons, qui est non invasive et de haute résolution spatiale, peut procurer une stratégie prometteuse de restauration visuelle pour activer de façon sélective dans l'espace et le temps les neurones du système visuel.

Pour les différents protocoles expérimentaux, nous utiliserons au maximum 697 rats. Nous avons recours à ce modèle animal car il nous faudra valider les approches techniques sur le système visuel dans son intégrité : de l'œil jusqu'au cerveau.

L'utilisation de l'animal est indispensable à cette étude car nous avons besoin d'un système biologique intégré : de l'œil jusqu'au cerveau. Dans le souci de respecter la règle des 3R, nous utiliserons le nombre de rats minimum pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique visé. Pour les procédures le nécessitant, l'administration d'analgésiques opioïdes en pré et postopératoire permettra de prévenir la douleur éventuelle due aux actes chirurgicaux. Les animaux seront stabulés dans les conditions conformes à la réglementation (portoirs ventilés dans des cages avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté). Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

6513. L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique représente un problème majeur de santé publique en France et dans le monde. A ce jour, les agents anti-plaquetaires qui préviennent la thrombose artérielle, c'est-à-dire la formation d'un agrégat composé de plaquettes notamment au niveau des coronaires, ne peuvent pas être utilisés dans le traitement de l'AVC en raison de la dangerosité du saignement qu'ils pourraient entraîner au niveau du cerveau. L'identification de nouveaux médicaments antiplaquetaires prévenant la formation de thrombi et ayant très peu d'effets sur l'hémostase physiologique constituerait une nouvelle approche pour le traitement de l'AVC.

Afin de limiter au maximum le risque d'effets secondaires lors du développement de nouveaux médicaments anti-thrombotiques, nous nous sommes intéressés à un récepteur exprimé uniquement sur les plaquettes sanguines. Le ciblage de ce candidat a démontré une efficacité en thrombose expérimentale chez la souris, sans en modifier l'hémostase. Ces études utilisaient un anticorps spécifique, qui a depuis été humanisé en vue de l'utiliser dans des essais cliniques chez l'homme.

Le but de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'intérêt du ciblage d'un récepteur plaquettaire dans différents modèles d'AVC.

Deux modèles d'AVC seront utilisés séquentiellement. Le premier consiste à réaliser une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne chez l'animal. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir étudier l'effet de l'agent bloquant sur les saignements intracrâniens. Le second modèle consistera à injecter des activateurs des plaquettes dans la carotide afin de générer des thrombi dans l'artère cérébrale moyenne. Ce modèle présente l'avantage de mimer au plus près les événements ischémiques rencontrés lors d'un AVC chez l'homme.

En cas de résultats positifs, les molécules évaluées pourraient être utilisées dans des essais cliniques chez l'homme. Cette stratégie permettrait de prévenir l'AVC sans augmenter le risque hémorragique et donc de limiter la mortalité et les risques d'handicap liés à l'AVC.

Limitation du nombre d'animaux :

Remplacement

Le but de ce projet est d'évaluer l'intérêt de cibler un récepteur spécifique des plaquettes dans l'AVC. Ce processus étant particulièrement complexe et faisant intervenir plusieurs types cellulaires ainsi que des conditions hémodynamiques, il nous semble impossible de substituer la souris à des modèles *in vitro*.

Réduction

Les souris utilisées pour les deux modèles d'AVC seront suivies par une technique d'imagerie non-invasive et non-ionisante qui permet :

1. le suivi des processus physiologiques ou pathologiques à étudier par une analyse qualitative et/ou quantitative des zones d'intérêts  
2. un suivi longitudinal sur un même animal de l'évolution d'un processus biologique. Les mêmes animaux seront utilisés après euthanasie pour une étude histologique, permettant de réduire le nombre d'animaux à inclure dans les études.

De plus, le nombre d'animaux utilisés sera donc réduit au maximum, avec la contrainte d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour chaque expérience, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les expériences à réaliser dans ce projet nécessitent une chirurgie fine et précise afin de permettre une reproductibilité des résultats obtenus. L'apprentissage de ces deux techniques avec un petit nombre d'animaux est donc indispensable pour s'assurer de la qualité des résultats obtenus et éviter de devoir faire d'autres séries de souris. La maîtrise de ces techniques permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés lors de ce projet.

Raffinement

Un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de copeaux de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C afin lutter contre l'hypothermie

- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
  - Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire pendant et après chaque procédure.
- Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.  
 Cette étude nécessitera l'utilisation de 380 souris.

6514. Avec plus de 8.8 millions de décès recensés en 2015 (OMS, 2017) le cancer représente aujourd'hui une cause majeure de mortalité dans le monde. Malgré l'amélioration des méthodes de prévention et de traitement, la formation de métastases au cours de cette pathologie reste particulièrement problématique. Le processus métastatique est initié lorsque les cellules tumorales de la tumeur primaire migrent vers la circulation sanguine afin d'envahir les autres organes et d'être à l'origine des tumeurs secondaires, appelées les métastases. Les métastases se forment par un long processus faisant intervenir plusieurs étapes, notamment l'invasion des cellules tumorales, la dissémination dans la circulation sanguine ou lymphatique, l'adhérence à la paroi des vaisseaux sanguins, l'extravasation et la formation de nodules métastatiques dans plusieurs organes, particulièrement le poumon, le foie et la moelle osseuse.

Outre leur rôle dans l'hémostase, les plaquettes ont été décrites pour être impliquées dans la dissémination métastatique. En effet, plusieurs études ont montré que ces dernières protègent les cellules cancéreuses circulantes du système immunitaire, facilitent l'adhésion des cellules cancéreuses à la paroi vasculaire et la transmigration des cellules tumorales. A ce jour, les mécanismes mis en jeu par les plaquettes dans la dissémination métastatique restent mal connus. Cette étude participera à mettre en évidence une stratégie de ciblage des plaquettes dans le cadre d'un traitement anti-métastatique.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance du compte plaquettaire et leur rôle dans les étapes tardives de la dissémination métastatique. Nous utiliserons au maximum 744 animaux (souris, *Mus musculus*) pour cette étude avec une évaluation et une analyse des résultats obtenues avant la poursuite des expériences et l'utilisation d'autres animaux. Les souris ayant un compte plaquettaire diminué (Thrombopénie) développeront plus ou moins de métastases pulmonaires, sans pour autant influencer l'hémostase. Les métastases pulmonaires peuvent gêner la respiration de l'animal nous porterons donc une attention particulière à la qualité de cette dernière. La thrombopénie sera induite par un anticorps spécifique des plaquettes sanguines. La formation de métastases sera évaluée après injection de cellules tumorales dans la circulation sanguine ou par le développement spontané de métastase issue d'une tumeur primaire.

Remplacer

Les études sur le rôle des plaquettes dans les métastases nécessitent d'utiliser des animaux car elles impliquent des interactions complexes entre les différents organes, la circulation sanguine et le système immunitaire qui ne peuvent pas être modélisées *in vitro*. Par contre toutes les études d'interaction plaquettes cellules tumorales seront effectuées *in vitro*.

Réduire

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une analyse statistique avec le t-test de Student. Les expériences seront dupliquées afin de consolider les résultats. Dans chaque expérience on retrouve 1 groupe témoin de 10 animaux + 1 groupe expérimental de 10 animaux = 20 animaux et chaque expérience est réalisée deux fois (duplicat) soit un total de 40 animaux par modèle. Les résultats seront analysés et la poursuite de l'étude sera évaluée après chaque étape afin de limiter le nombre d'animaux, si les résultats ne se révèlent pas convainquant.

Raffiner

Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible, la pathologie étudiée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail seront raffinées en utilisant des modèles aigües (sur 2 à 3 semaines), plutôt que des modèles génétiques qui durent plusieurs mois et ainsi limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux procédures expérimentales. Les animaux utilisés pour les expériences sont observés quotidiennement et le score du point limite évalué après les injections et deux fois par semaine pendant la durée de l'expérience (Poids, état général de l'animal avec l'observation des expressions faciales et l'état des tissus où les injections ont été réalisées). Pendant les procédures, les conditions d'hébergement sont adaptées à l'état des animaux et les soins opportuns sont appliqués. Une fois traités, les animaux retournent dans leur cage d'origine avec leurs congénères afin de conserver leur environnement (maison de taille adapté aux nombre de souris dans la cage, coton compressé et frisure de papier kraft, accès permanent à l'eau et à la nourriture et changement des cages tous les 10 jours).

Cette étude nécessite au maximum 744 souris.

6515. Ce projet s'inscrit dans un contexte de recherche préclinique sur les traitements de la douleur neuropathique. Celle-ci est par définition consécutive à une lésion ou une pathologie du système nerveux. Elle affecterait, en France, environ 6% de la population. Certains antidépresseurs et anticonvulsivants représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles. Cependant ils ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux. De plus, le mécanisme d'action de ces deux classes pharmacologiques dans le soulagement de la douleur neuropathique est, pour l'heure, encore mal connu.

Comprendre le mécanisme sous-jacent à l'action thérapeutique des antidépresseurs mais également des anticonvulsivants peut être important pour améliorer ces traitements. Ce projet participe à la compréhension du mécanisme thérapeutique des antidépresseurs et des anticonvulsivants sur la douleur neuropathique. Il sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Nous ne pouvons remplacer l'animal car il est nécessaire d'évaluer les effets thérapeutiques des différentes molécules testées, ainsi que leurs éventuels effets indésirables (pharmacologie *in vivo*), prévisibles ou pas, sur l'animal vigile. En effet, les expériences seront réalisées en minimisant autant qu'il en est possible de nombre d'animaux par condition expérimentale. Elles seront réalisées dans l'optique d'obtenir le maximum d'informations scientifiques par test, pour cette raison en fin d'expérimentation, les tissus seront prélevés sur les animaux sacrifiés.

pour analyser les changements moléculaires. Pour pouvoir raffiner les protocoles, les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout comportement d'inconfort. Au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique inter-individuelle, les groupes expérimentaux, explorant les actions des traitements sur la douleur neuropathique, seront constitués de 6 à 10 souris. Ce projet comporte 13 procédures expérimentales, mais certaines d'entre elles font partie d'un enchaînement et utilisent les mêmes animaux ce qui limite considérablement leur nombre. Le nombre d'animaux prévus est de 3854 souris pour 5 années.

6516. Les candidoses profondes sont la quatrième cause d'infection nosocomiale. Elles concernent principalement des patients atteints de pathologies engendrant une immunodépression soit par elles-mêmes soit due à leurs traitements.

Le taux de mortalité reste élevé même avec une prise en charge thérapeutique adaptée. De plus, des résistances aux traitements actuels sont décrites. Il est donc nécessaire de développer d'une part de nouveaux traitements mais aussi de mieux comprendre les mécanismes de défenses immunitaire mis en jeu par le patient pour lutter contre ces infections fongiques.

Cette procédure vise donc à évaluer dans un modèle murin l'efficacité de nouveaux composés pour le traitement des candidoses invasives. Elle nécessite l'utilisation de 900 animaux sur une période de 3 ans. Ce nombre d'animaux est prévisionnel et il est soumis à un fort risque de variations en fonction des résultats obtenus préalablement mais aussi du nombre de molécules expérimentales ayant passé les criblages *in vitro*, sur *Galleria mellonella* et de cytotoxicité. Il est donc basé et extrapolé du nombre d'expérimentations faites ces dernières années.

Les souris sont hébergées en groupe, dans un environnement enrichi.

Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en choisissant d'évaluer uniquement les nouveaux antifongiques ayant fait la preuve de leur activité *in vitro* et/ou dans un modèle alternatif (*Galleria mellonella*) et ayant montré une faible toxicité sur une lignée cellulaire mammifère.

La durée maximale du traitement est de 5 jours.

La souffrance animale est évaluée au cours du suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un "score de points critiques" dépassant le seuil défini est euthanasié.

6517. Le facteur de transcription HNF-4 alpha est exprimé dans le foie, le rein, le pancréas et l'intestin. Il contrôle l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique hépatique et pancréatique. Il existe une autre forme, codée par un gène différent, la forme HNF-4 gamma qui est exprimée aussi dans l'épithélium intestinal, le pancréas mais pas le foie et dont la fonction reste peu connue. Nos objectifs sont d'analyser les rôles respectifs de chacune des formes de HNF-4, alpha et gamma dans l'homéostasie énergétique en réponse à un environnement nutritionnel induisant une obésité et un diabète de type2.

Nous utilisons pour l'ensemble de ce projet :

Pour l'étude du rôle spécifique de HNF-4 alpha : un modèle de souris transgénique d'inactivation conditionnelle et tissu spécifique du gène HNF-4 alpha ainsi que la lignée contrôle. Ces lignées sont déjà établies.

Pour l'étude du rôle spécifique de HNF-4 gamma : un modèle d'inactivation totale et constitutive du gène HNF-4 gamma déjà établi ainsi que la lignée C57Bl6/J fournie par des établissements agréés.

L'ensemble de ce projet nous permettra de déterminer quels sont les rôles respectifs de HNF-4 alpha et HNF-4 gamma dans la susceptibilité à l'obésité et au diabète de type2.

Remplacement impossible : Notre objectif est d'étudier les rôles physiologiques des 2 formes d'HNF-4 dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et énergétique, ce qui nécessite une approche *in vivo*.

Les différentes procédures sont appliquées au même groupe de souris pour une expérience. Il *in vitro* a ainsi respect du principe de Réduction du nombre des animaux grâce au Raffinement des protocoles: (1) enrichissement (coton, ou nids et/ou tunnels permettant l'escalade et la cache), acclimatation de 10 jours pour les animaux commerciaux, (2) protocoles de classe légère à modérée ne nécessitant pas d'anesthésie, (3) habituation des souris à la manipulation, (4) actes réalisés avec les meilleurs outils et par des personnes formées et habituées à les faire.

Nombre d'animaux expérimentés utilisé pour le projet : 192

6518. L'inflammation chronique de bas grade est reconnue comme un déterminant majeur de la pathogénèse du diabète de type 2 (DT2) et de ses complications cardiovasculaires. Elle est notamment conduite par une activation des monocytes circulants et des macrophages tissulaires (cellules immunitaires). La susceptibilité à développer un diabète de type-2 et de souffrir des complications cardiovasculaires semble être associée à des facteurs environnementaux. Des études récentes suggèrent que ces facteurs environnementaux se traduisent par une modification de l'expression des gènes (notamment inflammatoires) par des mécanismes épigénétiques (changement de l'expression d'un gène sans modification de sa séquence : une altération de la méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones). Parmi les modifications des histones qui influencent l'expression des gènes inflammatoires, celles qui surviennent sur la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27) ont été proposées comme étant à l'origine de l'inflammation dans le cancer de la prostate et dans le cancer du sein, et à l'origine de la sévérité de la réponse inflammatoire des maladies auto-immunes. En effet, l'acétylation et la méthylation de H3K27 est associée à une activation de la transcription de certains gènes inflammatoires. Ce projet vise à démontrer le rôle l'enzyme KDM6B (Histone Lysine Demethylase 6B) sur la modification de la méthylation H3K27 et son implication dans la pathogénèse du DT2 et de ses complications.

Nombre d'animaux utilisés : 340 souris (20 souris par groupe et par conditions expérimentales)

La stratégie des 3R sera respectée.

Remplacement : le modèle de référence dans l'étude de l'obésité est la souris. Lorsque cela est possible, toutes les expériences préliminaires sont réalisées *in vitro*.

Réduction : Pour chaque protocole, des groupes de 20 souris seront créés afin de prendre en compte la mortalité naturelle et intrinsèque à l'étude et d'obtenir des groupes suffisamment puissants à la fin de l'étude pour obtenir des résultats significatifs.

Raffinement : Les animaux sont acclimatés à l'animalerie et sont habitués à être manipulés avec un suivi de poids hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. L'acclimatation se fait donc selon les règles éthiques imposées par la réglementation ainsi que par le CEF pendant 3 semaines avant le début de l'expérience.

6519. De nombreuses pathologies peuvent conduire à une dégénérescence de cellules rétinienne et conduire à une cécité partielle ou totale parmi lesquelles on retrouve le glaucome et les neuropathies optiques qui se caractérisent par une perte des cellules ganglionnaires rétiniennes. La prévalence du glaucome est mal définie mais estimée entre 2 et 7 % de la population totale et son incidence augmente avec l'âge. La Neuropathie optique, plus rare (prévalence estimée : 1/50 000) est une pathologie d'origine génétique mitochondriale actuellement sans aucun traitement.

Des essais de thérapie génique sont actuellement en développement mais ne peuvent concerner que la neuropathie optique héréditaire et à condition d'intervenir avant une perte cellulaire trop importante.

Le projet présenté vise à évaluer le potentiel thérapeutique d'une approche de thérapie cellulaire par transplantation chez le rongeur de cellules ganglionnaires rétiniennes générées *in vitro* à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSCs). Nous chercherons à déterminer i) la capacité de survie et d'intégration dans la rétine hôte. ii) Nous évaluerons la capacité des cellules ganglionnaires rétiniennes transplantées à générer de nouveaux axones et à rétablir des connexions avec les structures cibles cérébrales. A cette fin, les expériences de transplantations seront réalisées dans un modèle de neuropathie induite par lésion chirurgicale du nerf optique (chez le rongeur). Des tests électrophysiologiques et comportementaux seront utilisés pour évaluer le bénéfice de la transplantation sur les fonctions visuelles et la fonctionnalité des cellules transplantées. Des analyses histologiques post-mortem seront également menées afin d'évaluer le taux de survie des cellules transplantées, leur localisation précise, leur degré de différenciation, leur intégration dans le circuit rétinien et leur patron de projection (cibles atteintes) intracérébral.

Au total 230 animaux (souris normales, non transgéniques) sont prévus pour cette étude sur 4 ans.

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

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

6520. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance après 50 ans et on estime à un million le nombre de personnes concernées. A ce jour, la cause précise de la maladie est encore inconnue, mais plusieurs hypothèses concernant le développement de la pathologie ont été proposées. En réalisant un criblage génétique *in vitro* avons identifié plusieurs gènes impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de la DMLA. Ce projet a pour but d'étudier certaines de ces hypothèses ainsi que de valider *in vivo* les effets des gènes identifiés *in vitro*, en régulant leur expression (surexpression ou inhibition) de manière ciblée dans l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) chez la souris. Ces études devraient permettre de mieux comprendre la physiopathologie de la DMLA et de développer de nouveaux traitements pour l'homme.

Un total de 492 souris sera utilisé pour réaliser ces expériences sur une durée totale de 5 ans, ce qui représente une moyenne de 100 souris par an.

La règle des 3R sera appliquée. Remplacer : Ce projet fait suite à plusieurs tests sur cellules démontrant sans conteste l'implication des gènes d'intérêt dans la pathologie. Ces expériences de thérapie génique sont indispensables pour obtenir des preuves de concept plus solides *in vivo* et ainsi permettre la poursuite des projets vers le développement thérapeutique. Réduire : Nous réduirons au minimum le nombre de souris par groupe afin de pouvoir réaliser un test statistique. Raffiner : Une surveillance sera réalisée par le manipulateur pendant la durée de la chirurgie, lors du réveil et le lendemain matin. Les souris seront ensuite observées quotidiennement par l'animalier et/ou le manipulateur. Toutes les manipulations le nécessitant seront réalisées sous anesthésie générale et/ou locale et des traitements préventifs (antibiotique, anti-inflammatoire) seront utilisés afin de réduire les risques d'infection et de douleur. Le poids et l'apparence physique des souris seront vérifiés tout au long des procédures expérimentales. Une perte de poids très importante ou un signe révélateur de souffrances engendrera une euthanasie. Le comportement et la posture des souris seront également observés afin d'évaluer le degré de bien-être ou de douleur.

6521. Chez l'Homme, les patients atteints de maladie rénale chronique présentent une hyperhomocystéinémie et une acidémie méthylmalonique. L'hypothèse d'un déficit en vitamine B12 est avancée pour expliquer tout ou partie de cette augmentation des concentrations en homocystéine et en acide méthylmalonique. L'hyperhomocystéinémie est associée à des complications cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, thrombose veineuse...), bien que la causalité directe reste controversée. Les conséquences cliniques de l'acidémie méthylmalonique restent à déterminer.

Chez le Chat, une étude menée sur un faible nombre d'animaux a montré une augmentation de l'homocystéinémie chez des individus atteints de maladie rénale chronique, en comparaison avec une population d'individus sains. Toutefois, l'origine de cette augmentation et ses conséquences cliniques et/ou biologiques restent non élucidées. Aucune étude n'a porté sur le statut de la vitamine B12 et de l'acide méthylmalonique dans la maladie rénale chronique chez le Chat. Une étude clinique prospective a donc été programmée et validée par le comité d'éthique en recherche clinique de l'établissement.

Les conditions pré-analytiques (conditions de prélèvement et de stockage du plasma) pour le dosage de l'homocystéine et de l'acide méthylmalonique plasmatiques chez l'Homme sont très standardisées. En conséquence, une étude des conditions pré-analytiques pour le dosage de ces paramètres biologiques chez le Chat est nécessaire à la détermination des valeurs de référence pour l'espèce et à l'interprétation de variations (exemples : hyperhomocystéinémie, acidémie méthylmalonique) dans certains contextes pathologiques (comme la maladie rénale chronique). L'étude des facteurs pré-analytiques suivants est envisagée chez huit chats adultes d'expérimentation, en bonne santé : délai de séparation du plasma, conditions de stockage du plasma, temps d'échantillonnage (variation inter-journalière et intra-journalière), statut post-prandial et tests d'interférence (effet de l'hémolyse, de la lipémie et de l'hyperbilirubinémie). Le nombre d'animaux a été établi dans le but d'optimiser le nombre de données à inclure dans le modèle statistique choisi et d'augmenter ainsi la puissance des tests statistiques. Afin de limiter le nombre de prélèvements pour chaque animal, certaines parties de l'étude seront couplées tout en prélevant une quantité totale de sang par animal et par semaine très inférieure à 7,5% de la volémie du Chat.

6522. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est un problème de santé publique majeur de par sa prévalence élevée, dans la population générale elle est estimée à environ 2% chez la femme et 4% chez l'homme. La prévalence augmente après la ménopause. Des études épidémiologiques ont mis en évidence que l'obésité est un facteur important du SAOS. Le SAOS est caractérisé par des occlusions partielles ou totales des voies aériennes supérieures (VAS) pendant le sommeil. Cette obstruction est liée à une relaxation inappropriée des muscles dilateurs des VAS. Les patients présentent également une somnolence diurne excessive. Les traitements typiques incluent de la pression positive continue, des appareils oraux, des interventions chirurgicales modifiant les VAS, et/ou la perte de poids; il n'existe pas de traitement pharmacologique.

Le projet a pour objectif, dans une logique translationnelle de caractériser les mécanismes associés à la mise en place du SAOS en s'appuyant sur des modèles de rongeurs. Les systèmes sérotoninergiques et les hormones sexuelles seront au cœur de nos investigations. Ce projet vise à développer et caractériser un modèle chronique de rongeurs SAOS en vue de tester différentes pharmacologies agissant notamment sur la somnolence.

Les résultats obtenus devraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le contrôle central des voies aériennes supérieures. Une meilleure compréhension de l'implication des systèmes sérotoninergiques et des hormones sexuelles, pourrait être un moyen de mieux « phénotyper » les patients et dans le futur offrir une prise en charge plus ciblée.

Nos caractérisations, moléculaire et physiologique, de souris obèses New Zealand Obese et leurs contrôles New Zealand Black nécessitera l'utilisation d'un total de 64 souris sur une période de 5 ans. Dans la mesure du possible, le remplacement des animaux par des méthodes alternatives (modèles mathématiques, méthodes *in vitro* ...) est préféré. Toutefois, vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design des expériences comportementales et des expériences de physiologie a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques. Enfin, le raffinement des méthodes expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale est mise en oeuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires et de points limites clairement établis. Les expériences seront menées par des personnels hautement qualifiés dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur.

6523. Depuis plusieurs années, le sandre, *Sander lucioperca* est devenu une espèce d'intérêt pour la diversification de l'aquaculture européenne. En effet, en plus de sa valeur récréative, la qualité de sa chair et sa valeur commerciale en font une espèce d'une grande importance économique. Jusqu'à aujourd'hui, la demande croissante en sandre était presque exclusivement fournie par les populations sauvages déclinantes (lacs, rivières...). Les populations aquacoles sont quant à elles faiblement représentées. Le but du projet va donc être de développer l'aquaculture du sandre afin d'approvisionner le marché. Pour cela, connaître et contrôler son cycle de reproduction afin d'obtenir des œufs et des larves de qualité pour reconstituer les stocks de géniteurs futurs est indispensable. Le cycle de reproduction des poissons est un processus compliqué régulé par un ensemble d'hormones indispensables à la fonction de reproduction. Pendant ce processus, une étape va être importante pour la réussite de l'aquaculture : la phase de maturation des ovocytes, précèdent l'ovulation et permettant de rendre ces derniers aptes à la fécondation. Or en aquaculture, cette étape ne se déroule pas correctement ce qui aboutit à l'absence d'ovulation et de ponte chez les poissons. Pour éviter cela et synchroniser les pontes, nous savons que des traitements hormonaux, à base de molécules régulatrices de la fonction de reproduction, sont utilisés. Certains traitements sont efficaces chez le sandre pour induire l'ovulation ; toutefois, aucun n'est idéal ayant chacun leurs avantages et leurs inconvénients (pourcentage d'ovulation insuffisant, quantité d'œufs produits, temps d'action trop long, déclenchement de la réponse immunitaire du poisson...). Enfin, au niveau physiologique, l'effet de ces traitements sur la reproduction est inconnu. Or, connaître l'effet de tels traitements sur la fonction de reproduction est indispensable pour développer l'élevage de cette espèce.

Dans le cadre de ce projet, l'objectif sera donc d'améliorer la reproduction du sandre en déterminant quel serait le meilleur traitement pour induire la reproduction du sandre. A cette fin, nous étudierons les effets déclenchés par ces traitements sur la reproduction du sandre sauvage au niveau physiologique (concentrations hormonales, pourcentage d'ovulation...). Nous utiliserons 81 femelles au total (9 poissons par groupe) qui seront anesthésiées et injectées avec l'un des 5 traitements étudiés. Il n'est pas possible d'avoir

recours à des modèles cellulaires ou moléculaires (remplacement non envisageable). Le nombre de poissons par groupe a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante mais aussi nécessaire pour espérer obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (réduction). Pour l'étude de l'effet des traitements sur la régulation des concentrations hormonales, 3 prises de sang, sous anesthésie, seront effectuées. Nous déterminerons aussi leurs effets sur les performances de reproduction (pourcentage d'ovulation). Au cours de l'expérience, l'apparition des points limites (changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire, apparition de nécroses ou de champignons) sera surveillée et la moindre souffrance de l'animal déclenchera sa sortie de l'expérience (raffinement).

6524. La dysplasie bronchopulmonaire (BPD) est une affection respiratoire chronique qui se développe chez des nouveau-nés prématurés présentant un faible poids. Elle est secondaire à un arrêt du développement pulmonaire distal et se manifeste par une oxygénodépendance persistante à 36 semaines d'aménorrhée. Des atteintes vasculaires sévères et diffuses entraînent une hypertension pulmonaire (HTP), complication évolutive grave de la BPD puisqu'elle multiplie par 4 le risque de décès des enfants atteints de BPD sévère. Les mécanismes de l'HTP secondaire à une BPD (HTP-BPD) sont encore mal connus et l'on ne dispose pas de stratégie thérapeutique suffisamment efficace.

L'objectif de ce projet est de développer un modèle animal d'HTP-BPD permettant d'étudier des mécanismes impliqués dans l'HTP-BPD et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce modèle, déjà décrit dans la littérature, des rats nouveau-nés sont exposés à une atmosphère contenant 90% d'oxygène dans les 24h suivant la naissance et pendant 14 jours. Ce modèle reproduit chez le rat nouveau-né les altérations physiopathologiques observées chez le grand-prématuré et nous permettra donc d'en caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires. L'efficacité des traitements, choisis en fonction des anomalies observées, pourra aussi être évaluée sur ce modèle.

Nous envisageons d'étudier environ 5 portées par an, dans chacun des groupes (malade et contrôle). Les portées comportant en moyenne 12 animaux, l'étude portera sur environ 120 animaux malades ou contrôles par an, soit au total 600 animaux sur 5 ans. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux inclus dans cette étude, une planification sera établie pour optimiser au mieux les techniques réalisées sur chaque animal. Une attention permanente sera portée au bien-être des animaux tout au long du protocole, en particulier par une surveillance quotidienne et par l'enrichissement du milieu. L'exposition à l'hyperoxie n'induit pas de souffrance en elle-même. Les échographies et la mesure de pression ventriculaire cardiaque seront réalisées sous anesthésie afin d'éviter le stress et la perception de toute douleur et les animaux seront mis à mort à la fin de cette expérimentation, sans réveil.

Parallèlement à ce protocole, des études seront réalisées sur des cellules de poumons humains en culture, exposées ou non à l'hyperoxie. Ce remplacement du modèle animal par un modèle *in vitro* permettra d'élucider certains mécanismes intracellulaires sans utiliser d'animaux.

6525. Le bouleau représente le premier arbre responsable de pollinoses printanières en France. La pollinisation se déroule entre mars et mai et la durée de pollinisation a augmenté au cours des dernières décennies avec mise en cause du réchauffement climatique. En France, la sensibilisation au pollen de bouleau varie de 6% à 16% selon un gradient nord-sud. Les patients allergiques produisent des IgE spécifiques de Bet v 1, allergène majeur du bouleau. Le traitement de désensibilisation de l'allergie au pollen de bouleau repose sur une immunothérapie par voie sublinguale (Staloral® Bouleau, Stallergènes). Ce traitement induit chez beaucoup de patients des réactions locales au niveau buccal et/ou gastro-intestinal (telles que brûlures, démangeaisons, rougeurs, gonflements, nausées, vomissements) nécessitant l'arrêt du traitement.

Ce projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité du traitement de l'allergie au pollen de bouleau par voie épicutanée. Ce traitement par voie épicutanée serait une alternative au traitement par voie sublinguale responsable de nombreux effets secondaires conduisant à l'arrêt prématuré du traitement.

Pour évaluer ce produit, un modèle murin de sensibilisation au pollen de bouleau sera développé en tenant compte des modèles déjà décrits dans la littérature scientifique. Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (remplacement, réduction, et raffinement). En effet, l'évaluation de l'efficacité du traitement par voie épicutanée ne peut être réalisée dans des modèles *in vitro* (remplacement) car il est impossible. Nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 360 souris femelles, âgées de 5 semaines. Le protocole est planifié de telle sorte que toutes les analyses sont réalisées sur le même animal sans créer de souffrance ou de douleur supplémentaire (i.e. analyses de la réponse immunitaire et de l'hyperréactivité bronchique). Le bien-être des animaux (raffinement) est également planifié, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées permettant ainsi l'absence de signes de stress et avec un enrichissement du milieu d'hébergement. Notre projet permettra d'évaluer complètement la réaction allergique à un aéro-allergène au vue de la complexité des mécanismes immunologiques mis en jeu.

6526. Le cancer est un véritable fléau de notre société et touche e nombreux organes à tous les âges. Le but du projet est de tester l'effet antitumoral de différentes molécules dont nous ne pouvons pas révéler l'identité ici.

Les tests préliminaires sur cellules ont été réalisés et permettent aujourd'hui d'envisager des tests in-vivo pour une preuve de concept. Ces tests supplémentaires ne peuvent être réalisés que sur animaux vivants.

Les animaux utilisés pour ces tests sont 84 souris. Ce nombre est le minimum qui permettra d'obtenir des résultats permettant de conclure sur l'efficacité du traitement d'une tumeur.



Des cellules tumorales seront injectées sur le flan de la souris et après apparition de la tumeur, celle-ci sera traitée par injection des différentes molécules à visée thérapeutique. La croissance tumorale sera suivie afin d'observer l'efficacité du traitement sur la diminution de la taille de la tumeur. Nous serons attentifs au bien-être animal par l'utilisation de points limite adaptés si nécessaire.

6527. La recherche et le développement de nouveaux médicaments impliquent plusieurs étapes, depuis la découverte de molécules potentiellement thérapeutiques (« drug discovery ») jusqu'à la mise sur le marché d'un médicament. La première étape consiste en une sélection (« screening ») de molécules d'intérêt, qui devront ensuite être testées *in vitro* sur des cultures cellulaires puis nécessairement *in vivo* chez des animaux vivants avant d'être testées en clinique chez l'Homme.

Les tests *in vivo* visent à caractériser les effets et le comportement de molécules candidates après administration chez l'animal. Il est notamment indispensable d'évaluer différents paramètres dont ceux d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME) des molécules car ce sont des éléments cruciaux pour la sélection de candidats médicaments.

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

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

Sur une période de 5 ans, à raison de 6 lots par an, il est prévu d'utiliser 360 lapins pour l'évaluation de la pharmacocinétique de nouvelles molécules thérapeutiques.

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

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

6528. Le chondrosarcome (CHS) est une tumeur osseuse maligne primitive se développant à partir du tissu cartilagineux. Son abondante matrice extracellulaire de nature chondrogénique ainsi que l'absence de vascularisation limitent la diffusion de molécules thérapeutiques jusqu'au tissu tumoral, faisant du CHS une tumeur chimio- et radio-résistante. Le seul traitement efficace à ce jour reste la chirurgie qui possède un taux de survie à 10 ans de seulement 29 % en cas de rechute et dans les formes les plus graves. Pour pallier à ce problème, notre unité développe une nouvelle stratégie thérapeutique bi-spécifique qui vise à exploiter les deux caractéristiques du microenvironnement tumoral, à savoir une matrice extracellulaire riche en protéoglycanes et un tissu hypoxique, afin d'adresser, de façon spécifique, des molécules thérapeutiques jusqu'à leur cible. Pour cela, une prodrogue activable en hypoxie et vectorisée vers les protéoglycanes du CHS par un vecteur ammonium quaternaire a été synthétisée par notre équipe de chimistes et sélectionnée sur la base de son activité *in vitro*.

Les objectifs de cette étude seront : 1- de déterminer l'efficacité antitumorale de cette molécule, comparativement (i) à son équivalent non vectorisé, (ii) à un équivalent vectorisé mais non activable en hypoxie, (iii) à une prodrogue de référence le TH-302, (iv) à un groupe contrôle. L'efficacité antitumorale de ces molécules sera déterminée sur un modèle de chondrosarcome humain implanté en sous cutané sur des souris immunodéprimées de type NMRI-NUDE (Foxn1nu /Foxn1nu). Pour cela 15 souris par groupe seront utilisées, pour un total de 75 souris nécessaire. 2-de déterminer les effets indésirables que les molécules peuvent engendrer : variation du poids des souris, Analyses sanguines (NFS), suivi de l'état général des souris.

3- de caractériser l'activité anticancéreuse sur les tumeurs prélevées à différents stades.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Concernant le Raffinement, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée en surveillant les points limites (Perte de poids, Œil clos, diarrhée...). Toute observation d'un de ces points limites conduira à la sortie de l'animal du protocole et à son euthanasie. Cette décision sera prise par le responsable du projet.

Au final, ces études précliniques devraient permettre de valider la double approche de sélectivité pour la prise en charge thérapeutique du chondrosarcome.

6529. Le vieillissement des protéines, qui aboutit au vieillissement de l'organisme, est la conséquence de plusieurs réactions qui consistent en la fixation de métabolites simples sur leurs groupements fonctionnels. Dans notre étude, nous nous intéresserons à la

réaction de carbamylation qui correspond à la fixation de cyanate sur les protéines. Le cyanate provient de plusieurs sources, l'une d'elle est liée à la décomposition de l'urée, une autre dépend de la myéloperoxydase qui transforme le thiocyanate de l'environnement en cyanate. L'importance physiologique relative de chacune de ces deux voies n'est pas connue. Au cours de l'insuffisance rénale chronique la voie de l'urée pourrait être prépondérante, mais l'inflammation chronique liée à cet état pathologique pourrait favoriser également la voie de la myéloperoxydase. Le but de cette étude est de déterminer à l'état basal, physiologique, l'importance relative de chacune de ces deux voies. Pour cela nous étudierons la carbamylation des protéines tissulaires et sériques de souris déficientes en myéloperoxydase et nous les comparerons à des animaux non déficients. Au total 24 souris seront utilisées pour l'expérimentation qui sera réalisée deux fois (48 souris au total).

Le nombre d'animaux est réduit au maximum et est déterminé par la nécessité d'obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique. Les tests statistiques choisis sont adaptés à de petits effectifs. Les animaux seront hébergés selon les conditions légales dans des cages enrichies (rouleaux de carton rigide dans les cages). Les prélèvements sanguins et tissulaires ne seront réalisés qu'au moment de l'euthanasie de l'animal sous anesthésie profonde.

6530. Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité dans le monde à la fois chez les hommes et les femmes. Elles représentent un véritable enjeu de santé publique. Il est admis que le régime alimentaire a un impact sur la santé et les maladies cardiovasculaires et pourrait donc constituer une cible pour la prévention de ces maladies. En effet, récemment, un lien entre les maladies cardiovasculaires, le métabolisme, les mitochondries et le régime alimentaire a été mis en évidence. Les mitochondries apparaissent comme des acteurs indispensables dans le développement de la cytoprotection induite par l'alimentation, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de mieux appréhender les voies cytoprotectives qu'elles contrôlent, tel le métabolisme cellulaire, le stress oxydant, l'autophagie et la mort cellulaire.

Ce projet consiste à tester l'effet cardioprotecteur de baies fournies par l'alimentation dans un modèle validé de rats rendus hypertendus et insuffisants cardiaques par un apport en sel. Cette approche nutritionnelle vise à limiter les atteintes cardiovasculaires par des substances naturelles non toxiques. En se basant sur la littérature et notre expérience, notre hypothèse est que les baies auront un effet bénéfique sur le cœur des rats malades et une absence d'effet chez les rats sains.

Grâce à la combinaison d'approches physiologique et biochimique, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les effets cytoprotecteurs cardiaques des baies seront caractérisés. Ce projet permettra de fournir des connaissances concernant la bio-efficacité des polyphénols de fruits dans la cardioprotection. La caractérisation des cascades de signalisation conduira à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de combinaisons de molécules destinées à améliorer la fonction cardiaque et le tableau clinique du malade hypertendu et insuffisant cardiaque.

Le modèle génétique de rat choisi présente l'avantage d'être un modèle validé et en relation avec le contexte sociétal et l'engouement des populations pour les alicaments naturels. Il offre la perspective d'identifier et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires. A plus long terme, ce projet pourra permettre d'apporter des possibilités de traitements et de prévention de l'insuffisance cardiaque.

Ce projet est justifié par la thématique de recherche du laboratoire qui inclut l'exploration fonctionnelle cardiovasculaire, l'étude du fonctionnement cardiaque, la biologie cellulaire de la cellule cardiaque et la biochimie des protéines en tant qu'effecteurs des voies de signalisation normales et pathologiques. Ceci requiert donc l'utilisation de mammifères et ne peut être remplacé par des cultures cellulaires (les cellules cardiaques ne se divisent pas) ou des espèces telles le nématode, la levure, ou encore les bactéries. Dans ce contexte, le rongeur de type rat permet un compromis entre la pertinence par rapport à l'homme, le coût total, et la quantité de tissu disponible pour les analyses. Le nombre de rat sera réduit au maximum, tout en tenant compte des résultats des études antérieures, mais afin d'avoir suffisamment de rats pour des effets statistiquement significatifs. Le nombre de rat par groupe sera déterminé à l'aide d'un logiciel statistique se basant sur la puissance des tests. Ainsi, les groupes contiendront entre 8 et 14 rats/groupe avec un maximum de 132 rats pour l'étude complète. Les procédures seront étudiées par des méthodes permettant de limiter le plus possible la douleur, la souffrance, l'angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux. Une grille des points limites a été établie. Les sacrifices sont effectués aux termes de l'expérience sauf en cas de souffrance. Les animaux sont surveillés tous les jours. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement)

6531. La demande concerne la production de lapins transgéniques chez lesquels le transgène permettra la synthèse d'une protéine A fluorescente (nommée AF) dont le rôle et la localisation sont en tout identiques à ceux de la protéine A native. La protéine A est une protéine intracellulaire, indispensable aux déplacements des chromosomes au cours des divisions cellulaires (mitose et méiose). Il n'existe pas d'outils efficaces pour détecter la protéine A dans les cellules. Grâce à sa fluorescence, la protéine AF sera localisée beaucoup plus facilement que la protéine A, ce qui permettra de mieux connaître les mécanismes de ségrégation des chromosomes au cours des premières divisions cellulaires de l'embryon et au cours de la formation des gamètes (ovocytes et spermatozoïdes).

Une telle étude n'a encore jamais été faite chez un mammifère.

La fluorescence est due à l'addition d'un motif particulier dans la protéine A, motif naturellement présent chez des organismes marins (méduses, coraux). Ce motif fluorescent a déjà été rajouté à d'autres protéines pour une utilisation en transgénèse chez de nombreuses espèces de mammifères, de poissons, d'amphibiens et d'insectes, et n'a jamais provoqué l'apparition d'un effet délétère. De plus, des drosophiles transgéniques exprimant le gène AF ont déjà été produites, sans effet délétère sur l'insecte. Nous supposons qu'il en sera de même chez le lapin.

Les animaux génétiquement modifiés obtenus seront toutefois surveillés pour détecter toute altération éventuelle de leur état de santé.

Le gène AF sera ajouté par injection d'ADN dans des embryons unicellulaires. Ces derniers auront été récupérés par lavage des voies génitales prélevées après abattage de femelles traitées par traitement de superovulation. 20 femelles "donneuses" seront mises à mort pour récupérer 300 embryons. Après injection, les embryons seront transférés dans les voies génitales de femelles "receveuses" traitées hormonalement pour développer une gestation. 20 femelles receveuses seront utilisées.

Dix à quinze jours après la naissance, la réussite de l'intégration de l'ADN injecté sera recherchée dans le génome des petits; les animaux génétiquement modifiés (ADN intégré) seront conservés pour générer chacun une lignée par croisement avec d'autres lapins. Les animaux non génétiquement modifiés (pas d'intégration de l'ADN) seront euthanasiés rapidement.

Pour chaque lignée obtenue, des embryons et/ou du sperme seront congelés pour conserver la lignée.

Aucun modèle "*in vitro*" ne peut remplacer les animaux dans ce protocole. En effet, un des objectifs est d'observer le comportement de la protéine AF dans les gamètes pendant la méiose puis après la fécondation au cours des premières étapes du développement de l'embryon. Actuellement, on ne sait pas mettre en culture des fragments d'ovaires et de testicules pour produire des gamètes ni pour observer le déroulement de la méiose. De plus, chez le lapin, la fécondation *in vitro* à partir de gamètes qui auraient été collectés sur des animaux n'est absolument pas maîtrisée. Il est donc nécessaire d'utiliser des animaux pour pouvoir étudier ces phénomènes.

Nous veillerons utiliser le plus petit nombre d'animaux en suivant les procédures suivantes:

- 1- Le traitement de superovulation des femelles permet d'augmenter le nombre d'embryons produits par femelle et donc de mettre à mort le moins de femelles "donneuses" possible.

- 2- Notre objectif est d'obtenir au moins 3 lapereaux génétiquement modifiés. Dès que ces trois lapereaux seront obtenus, la collecte d'embryons sera arrêtée et aucune femelle ne sera ni traitée hormonalement ni mise à mort ni opérée pour des transferts d'embryons.

- 3- Chaque femelle receveuse pourra recevoir 30 embryons par transfert, nombre classiquement adopté pour cet acte, qui permet d'utiliser peu de femelles tout en obtenant un bon taux de gestation.

Toutes les précautions seront prises pour gérer de façon optimale les douleurs éventuellement engendrées:

- - surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes d'altération de la santé. Les procédures opératoires seront raffinées autant que possible (anesthésie, analgésie, soins post opératoires).

- - demande d'intervention auprès des vétérinaires présents sur le centre (dans l'unité, au sein de l'unité élevage du centre) ou le vétérinaire sanitaire responsable du bâtiment. Les recommandations du vétérinaire seront alors suivies pour soigner l'animal ou supprimer la douleur. Si les soins n'apportent aucun résultat positif, l'animal sera euthanasié.

- - dans le cas de femelles en gestation, si la mise-bas n'a pas eu lieu à la date théorique, une détection de la gestation pourra être faite (échographie, palpation). Sur avis du vétérinaire, une induction hormonale de la mise bas ou une césarienne pourront être pratiquées et les petits adoptés par une femelle de l'élevage au cas où la mère ne serait pas capable d'allaiter ses petits.

Des précautions comportementales seront mises en place : les animaux seront isolés (1 animal par cage) après leur sevrage (7 semaines après la naissance environ). Les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels. Chaque cage est agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace. Des enrichissements seront proposés aux animaux (balles type ping-pong). L'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) est contrôlé et maintenu stable au cours du temps.

6532. Chez la femme, une des pathologies gynécologiques impliquant le muscle utérin est l'accouchement prématuré (avant la 37<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée, soit 8 mois de grossesse).

D'après l'OMS, chaque année, quelque 15 millions de bébés naissent prématurément, ce qui représente plus d'un bébé sur 10. Plus d'un million d'enfants décèdent chaque année en raison de complications liées à la prématurité (plus la naissance est précoce, plus les risques de séquelles sur les plans respiratoire et neurologique augmentent). A l'échelle mondiale, la prématurité est la première cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans. Dans presque tous les pays disposant de données fiables, les taux de naissances prématurées sont en hausse.

Sur 184 pays, le taux des naissances prématurées varie entre 5% et 18 % des bébés nés.

Il est toutefois possible d'agir pour empêcher que les bébés naissent prématurément soit par un simple repos à domicile, soit par une hospitalisation avec des médicaments bloquant les contractions, ceci en fonction de la santé de la mère et de la date de son terme.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle d'accouchement prématuré chez la souris gestante afin de tester l'efficacité de candidats médicaments à retarder ou arrêter un accouchement prématuré.

Actuellement, les méthodes alternatives *ex vivo* permettant d'étudier l'accouchement prématuré dans son ensemble n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1608 souris en raison 12 souris par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 10 animaux inclus), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant de réaliser les expérimentations sous caméra afin de suivre un même animal sur quelques jours. Toutefois l'animal ne pouvant pas être dans ce projet son propre contrôle, nous apporterons une attention particulière à son bien-être, avec l'ajout de nourriture dans la cage d'expérimentation ainsi, que des enrichissements type carré de coton pour la nidation.

De plus, ce projet est complémentaire d'un autre projet visant à évaluer, chez les rattes gestantes, l'effet de candidats médicaments sur les contractions utérines.

6533. La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est la leucémie aiguë de l'adulte la plus commune. En Europe et aux Etats-Unis, l'incidence et le taux de mortalité de la LAM sont d'environ 4/100.000 et 3/100.000 par an, respectivement. En dépit d'un taux élevé de rémissions complètes après traitement avec les agents génotoxiques, le taux de rechute demeure très important. La survie globale à 5 ans est seulement de 30-40% chez les patients de moins de 60 ans, et de 20% pour les plus de 60 ans. La chimiothérapie de première ligne est souvent efficace pour éliminer les cellules leucémiques, mais des rechutes éloignées sont observées chez la majorité des patients, caractérisées par l'amplification de clones leucémiques chimiorésistants. L'ensemble de ces données justifie le besoin urgent d'augmenter le répertoire actuel de l'option thérapeutique.

L'objectif de cette demande est de développer les modèles précliniques spécifiques de la leucémie aiguë de la lignée myéloïde (LAM) qui permettront notamment (cela fera l'objet de futures nouvelles demandes) de tester différentes stratégies thérapeutiques innovantes ou de caractériser et de lutter contre les phénomènes de résistances aux chimiothérapies trop fréquemment observés en clinique. Ces modèles que nous souhaitons mettre en place, basés sur la xénogreffe de cellules leucémiques humaines à des souris immunodéficientes, sont largement décrits dans la littérature et il n'existe à l'heure actuelle, aucune autre méthode satisfaisante qui pourrait se substituer à l'expérimentation animale durant cette étape préclinique.

Dans la présente demande d'autorisation, nous planifions l'établissement d'une biobanque de LAMs chez la souris NSG, qui devra être caractérisée en termes de temps de progression, de distribution systémique, de transplantations sériées ainsi que pour leur sensibilité/résistance à la cytarabine, le traitement référence actuellement en clinique. L'ensemble de ces données sera utile à plusieurs projets fondamentaux de notre centre de recherche qui concernent notamment les phénomènes de résistances thérapeutiques. En outre, à l'heure de la médecine personnalisée qui va proposer un traitement plus ciblé sur la diversité moléculaire/cellulaire du patient, la xénogreffe de leucémie primaire humaine constitue le modèle préclinique à même de « mimer » la maladie observée chez le patient et de prédire la réponse thérapeutique d'une leucémie donnée à un traitement précis. Les xénogreffes vont permettre de développer des essais cliniques de nouvelles générations. Ces essais, dits « co-cliniques », permettront de tester en simultané différentes options thérapeutiques pour une LAM xénogreffée et ainsi orienter le traitement du patient.

Nous utiliserons la méthode des 3 R pour réduire à son minimum le nombre d'animaux et, chaque fois que cela sera possible, le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro*. Dans un souci de raffinement et de réduction, le suivi du développement leucémique se fera par des mesures cinétiques utilisant des procédés peu (prélèvement sanguin sous anesthésie) ou pas invasif, à savoir les techniques de cytométrie de flux ou la bioluminescence, respectivement. Afin de réduire le stress et d'améliorer le cadre de vie des animaux au cours des procédures nécessaires pour répondre à nos objectifs, nous optimiserons les conditions d'hébergement des animaux, par la présence d'enrichissement dans les cages (copeaux de bois compactés et/ou coton), et par le maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement. Par ailleurs, l'ensemble des procédures de transplantation, de prise d'échantillons sanguins et d'imagerie sera réalisé sous anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%).

Dans ce contexte, le nombre minimum mais nécessaire de souris a été calculé afin de couvrir la diversité moléculaire de la LAM et de fournir des résultats statistiquement significatifs pour la prédiction de la réponse thérapeutique des différentes leucémies ainsi établies. Ainsi, ce projet d'établissement de banque de xénogreffes utilisera 680 souris NSG transplantées avec des cellules de patients atteints de LAM.

6534. Chez la femme, une des pathologies gynécologiques impliquant le muscle utérin est l'accouchement prématuré (avant la 37<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée, soit 8 mois de grossesse).

D'après l'OMS, chaque année, quelque 15 millions de bébés naissent prématurément, ce qui représente plus d'un bébé sur 10. Plus d'un million d'enfants décèdent chaque année en raison de complications liées à la prématurité (plus la naissance est précoce, plus les risques de séquelles sur les plans respiratoire et neurologique augmentent). A l'échelle mondiale, la prématurité est la première cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans. Dans presque tous les pays disposant de données fiables, les taux de naissances prématurées sont en hausse.

Sur 184 pays, le taux des naissances prématurées varie entre 5% et 18 % des bébés nés.

Il est toutefois possible d'agir pour empêcher que les bébés naissent prématurément soit par un simple repos à domicile soit par une hospitalisation avec des médicaments bloquant les contractions, ceci en fonction de la santé de la future mère et de la date de son terme.

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

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par les textes réglementaires français issus de la transposition de la directive européenne 2010/63/UE, à savoir 2 ou 3 animaux par cage et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 630 rats en raison 10 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 8 animaux inclus), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

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

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

6535. L'obésité est associée à une diminution du statut en vitamine D (défini par la concentration plasmatique en 25-hydroxycholecalciférol, 25OHD). La causalité entre ces 2 paramètres reste à l'heure actuelle indéterminée. Toutefois des résultats précédents ont montré que les souris rendues obèses par l'alimentation présentaient un statut en vitamine D inférieur à celui de leurs congénères normopondéraux.

Parmi les hypothèses pouvant expliquer les différences observées (pour un apport identique en VD), il a été suggéré que la vitamine D pourrait se trouver "piégée" (non-disponible) dans l'excès de tissu adipeux des individus obèses. Afin de vérifier cette hypothèse, nous étudierons l'effet d'une perte de masse grasse chez la souris obèse sur son statut en VD par diminution de l'apport énergétique. Pour cela, nous utiliserons des souris C57bl6 males âgées de 7 semaines et les soumettrons à un régime hyperlipidique (60% de l'apport énergétique sous forme de lipides, HF60) pendant 8 semaines pour induire une obésité modérée. La moitié des animaux recevra alors une alimentation différente (LF10, apportant uniquement 10% de l'énergie sous forme de lipides), ce qui entrainera une perte de masse grasse progressive des animaux, pendant que l'autre moitié ne verra pas son régime modifié.

Un troisième groupe (contrôle négatif), recevra le régime LF10 pendant toute la durée de l'étude.

Des animaux seront euthanasiés après 8 semaines pour évaluer l'effet du régime HF60 sur les différents paramètres en lien avec l'obésité et le statut en vitamine D avant perte d'adiposité. Les autres animaux seront sacrifiés 4 semaines plus tard pour étudier l'effet de la perte de masse grasse.

Ce projet mettra en œuvre des méthodes peu invasives (mesure de la prise de masse corporelle, suivi de la consommation alimentaire) relativement fréquentes, ce qui permettra d'habituer les animaux à la manipulation et ainsi diminuer le stress pouvant être occasionné par les prélèvements sanguins nécessaires à l'évaluation de la glycémie et de l'insulinémie (après 0, 8 et 12 semaines), paramètres associés au développement de l'obésité. Les animaux seront hébergés en cages conventionnelles par groupes de 3 ou 4 individus, et l'environnement sera enrichi par l'ajout d'igloo en plastique et de nid végétal.

Au total, 50 animaux seront nécessaires (groupe de 10 animaux) afin de disposer de l'effectif minimum permettant de mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres étudiés.

## 6536. CONTEXTE

Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Cinq souches ont été identifiées :

Zaïre, Bundibugyo, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Le virus à l'origine de la flambée 2014 en Afrique de l'Ouest appartient à la souche Zaïre (appelée également souche Gabon).

Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie. Les flambées de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie. La flambée qui a sévi en Afrique de l'Ouest (premiers cas notifiés en mars 2014) a été la plus importante et la plus complexe depuis la découverte du virus en 1976. Elle a produit plus de cas et de décès que toutes les précédentes flambées réunies. Cette flambée a également comme particularité de s'être propagée d'un pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre). D'après de récentes données, l'épidémie a provoqué plus de 20 000 cas dont 10 000 décès. Les pays les plus touchés (la Guinée, la Sierra Leone et le Libéria) ont des systèmes de santé très fragiles. Le 8 août 2014, il a été déclaré que cette flambée constituait une urgence de santé publique de portée internationale.

Aucun traitement homologué n'a pour l'instant démontré sa capacité à neutraliser le virus. L'immunisation passive représente une piste à explorer. En effet, dès l'épidémie de 1976, un technicien de laboratoire infecté par le virus Ebola a été traité et guéri par le sérum d'un patient convalescent. En 1995 à Kikwit, la même expérience a été menée sur 8 patients dont 7 ont survécu. Plusieurs publications ont montré l'effet protecteur de traitement post infection par des anticorps poly ou monoclonaux chez les primates non humain (PNH). Une approche alternative à l'utilisation de sérum de patient convalescent est la production de sérum immuns produit chez l'animal. C'est d'ailleurs une approche historique pour le traitement de maladies comme la rage, la diphtérie ou encore la peste.

## OBJECTIF

Le but de ce projet est de tester l'efficacité d'IgG hyperimmunes purifiées dirigées contre la glycoprotéine de surface du virus Ebola provenant de cochons immunisés, double KO pour la Neu5Gc et la 1-3 Gal, les deux xéno antigènes majeurs susceptibles de déclencher une réponse immune de type inflammatoire.

## PROCEDURE

Ce projet comporte une procédure qui nécessitera 30 cobayes Hartley. Cette espèce est sensible à une souche adaptée du virus Ebola. Ces derniers seront répartis en 5 groupes.

## CONFORMITE AVEC LES 3 R :

Dans la mesure où ces Ig ont montré une efficacité significative *in vitro*, la confirmation de cette efficacité dans un modèle rongeur adapté est une étape obligatoire. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables et statistiques. Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement alimentaire (fruity gems), l'enrichissement de confort (change de la litière fréquent) et sur l'enrichissement de stimulation (jeux en forme d'altère).

6537. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde. Le traitement du CHC est indispensable sous peine d'une évolution fatale. Depuis 2007, de nouvelles molécules ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique contre le CHC, et seul le Sorafenib dispose actuellement d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le

traitement du CHC. Bien qu'efficace dans le traitement du CHC avancé, le bénéfice en termes de survie reste modeste. De plus, 100% des patients développent plus ou moins tardivement une résistance à ce médicament. L'évaluation de nouvelles molécules reste donc un enjeu important. Le ramucirumab est une nouvelle molécule, avec des résultats encourageants dans le CHC. En effet, en première ligne, la survie globale et la survie sans progression sont prolongées. En seconde ligne, après résistance au sorafenib, des effets bénéfiques sont également observés sur la survie sans progression.

Plusieurs pistes sont actuellement explorées afin d'améliorer les options thérapeutiques proposées aux patients comme la combinaison du sorafenib avec d'autres molécules ou encore la compréhension des mécanismes qui empêchent le médicament de continuer à être efficace. Nous souhaitons tester 2 molécules expérimentales (anti-TGFbeta et anti-Notch) dont les cibles ont été montrées comme ayant un grand intérêt dans les cancers du foie humain, seules ou en combinaison avec des agents thérapeutiques ayant un effet inhibiteur sur la formation de vaisseaux alimentant la tumeur (anti-angiogéniques) approuvés (sorafenib ou ramucirumab).

La première phase d'étude des molécules d'intérêt a été menée *in vitro*, dans des modèles de cellules tumorales hépatiques humaines. Les effets anti-prolifératifs et anti-invasifs des molécules, seule et en combinaison ont été testés. Des résultats prometteurs ont été obtenus. Toutefois, l'utilisation d'animaux est nécessaire pour mettre en évidence les effets anti-tumoraux d'une molécule destinée à être utilisée dans le traitement contre le cancer chez l'Homme.

Ce projet propose d'utiliser un modèle de souris transgénique (ASV-B) développant un CHC mimant parfaitement la maladie qui se développe chez le patient et permet l'évaluation des effets de nouvelles molécules anti-cancéreuses sur la croissance tumorale ainsi que sur les nouveaux vaisseaux qui vont se développer pour nourrir la tumeur (lui permettant ainsi de croître et d'augmenter son potentiel métastatique).

La toxicité des molécules à tester a déjà été évaluée dans un autre laboratoire, et les doses ont été choisies en fonction de ces résultats. Pour l'ensemble du projet nous aurons besoin de 128 animaux ASV-B pour lesquels nous analyserons la croissance tumorale et la formation de nouveaux vaisseaux alimentant la tumeur (angiogénèse) en échographie doppler (mesure du volume hépatique et du flux dans les artères hépatiques et mésentériques), ainsi que l'immunomodulation, qui correspond à la modification de la population des globules blancs (répartitions entre les différents types de cellules, lymphocytes, macrophages, etc...) à des stades précoces. L'administration des médicaments se fera par la même voie d'administration que chez l'homme, soit par voie orale ou par injection. Le sorafenib, le TGFbeta1 seront administrés 5 fois par semaine du lundi au vendredi par voie orale, le Notchi trois fois par semaine par voie orale et le ramucirumab par injection deux fois par semaine.

Nous avons décidé de mener l'étude complète de toutes ces molécules en parallèle, afin de ne pas avoir à reproduire les groupes placebo et sorafenib plusieurs fois, permettant ainsi une diminution du nombre d'animaux utilisés.

Les points limites entraînant une euthanasie compassionnelle immédiate sont les suivants: perte de poids >20% (dans ce modèle la prise de poids dû à l'augmentation du volume hépatique ne compense pas les effets toxiques d'un éventuel médicament, d'après notre expérience), automutilation.

Les points limites autres : Isolement, yeux fermés, dos voûté, déshydratation. Dans un premier temps, le traitement de l'animal sera suspendu. Aucun traitement analgésique ne pourra être administré du fait de la toxicité hépatique de ces traitements et des effets modulateurs que cela pourrait avoir sur l'effet des traitements administrés dans le cadre de l'étude. Si l'animal ne se porte pas mieux après trois observations consécutives, l'animal sera mis à mort. Ces points seront surveillés cinq fois par semaine pour permettre de limiter la douleur de l'animal à son minimum.

Aucune procédure douloureuse n'est à envisager (chirurgie, injection d'un produit nécrosant, etc...).

Les souris seront hébergées en armoire ventilée (5 souris au maximum par cage) avec alimentation standard (régime de reproduction enrichi en protéines et lipides, Envigo 2018) et eau à volonté.

Cycles 12/12h

Température : 22°C

Aussi, les souris disposeront de fibres de peupliers leur permettant de construire un nid et ainsi améliorer leur condition d'hébergement.

Notre expérience avec ce modèle nous montre que pour obtenir des résultats statistiques concluants, il faut au moins 8 animaux par groupe pour les analyses en immunohistochimie ou les analyses par écho-doppler. Ainsi, 8 animaux par groupe doivent être mis à mort après 4 semaines de traitement (soit à un âge de 12 semaines des animaux), pour une analyse intermédiaire de l'angiogénèse et de l'immunomodulation en immunohistochimie. Et 8 animaux par groupe doivent être traités pendant 8 semaines (soit des souris âgées de 16 semaines). Permettant ainsi d'atteindre des résultats significatifs aux deux stades de la carcinogénèse étudiée, avec un minimum d'animal à chaque fois (8/groupe).

Le projet a pour but de montrer l'efficacité de nouvelles combinaisons thérapeutiques à fort potentiel dans le traitement du CHC.

6538. Le rétrovirus oncogène humain T-lymphotrope de type 1 (HTLV-1) infecte cinq à dix millions de personnes dans le monde. Trois à dix pourcent d'entre elles développeront une des maladies associées dont la leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL), lymphoprolifération maligne contre laquelle il n'existe aucun traitement efficace à ce jour. Notre approche consiste à trouver une stratégie qui permettrait d'induire l'expression virale *in vivo* tout en empêchant la transmission du virus à de nouvelles cellules. Notre étude sera réalisée *in vivo* sur 2 groupes de 5 singes *Papio anubis* naturellement infectés par STLV-1, l'équivalent simien d'HTLV-1. Les virus STLV-1 simiens et HTLV-1 humains sont en effet quasiment identiques et plusieurs cas de leucémies/lymphomes T, en tous points similaires à l'ATLL humain ont été décrits chez cette espèce. Tous les individus seront hébergés en groupe durant l'ensemble de l'étude. Les animaux seront traités à l'aide de deux molécules (une molécule antivirale et une molécule permettant de réactiver l'expression du virus). Ainsi, les cellules infectées par le virus seront éliminées par le système immunitaire et le virus ne pourra pas ré-infecter d'autres cellules. Deux groupes d'animaux sont nécessaires : l'un pour tester une

nouvelle molécule seule et l'autre pour tester la combinaison des 2 molécules. Le nombre de 5 animaux par groupe est le minimum afin de réaliser des études statistiques sur les résultats obtenus (diminution de la charge provirale, réactivation du système immunitaire, par exemple). De plus, ces individus seront leurs propres contrôles, diminuant ainsi de moitié l'effectif requis.

Il faut noter que même si tous les animaux impliqués dans l'étude sont naturellement infectés par le virus ils ne présentent aucun cadre symptomatique. Cette infection est caractérisée par une longue période asymptomatique et seulement 2,5 % de cas développent des pathologies graves. Tous les animaux seront hébergés en groupes sociaux de 2 à 3 individus durant l'ensemble de l'étude. Différents dispositifs d'enrichissement du milieu lié à l'alimentation seront mis en place quotidiennement afin de limiter au maximum le stress de l'isolement. Une fois l'étude finie, tous les animaux seront réintégrés dans leurs groupes sociaux d'origine.

6539. Le Syndrome d'Apnée Obstructive du Sommeil (SAOS) est une pathologie fréquente au niveau de la population française (4 - 6 %). Cette pathologie entraîne des ronflements voir des apnées obstructives, qui peuvent se répéter 100 fois par nuit. Ces apnées qui entraînent systématiquement des micro-réveils, ont des conséquences à terme pouvant être très graves sur la qualité de vie du patient (tel que somnolence excessive, risque élevé d'accident de la route, altération de l'humeur et dépression) mais aussi au niveau de la morbidité du patient (essentiellement cardiovasculaire et neurologique). La base de son traitement est la pression positive continue (PPC). Mais ce traitement, même s'il est efficace, est très contraignant (appareillage contraignant sur le visage), ce qui conduit à un abandon de traitement de l'ordre de 50 %. Les alternatives chirurgicales sont nombreuses, mais la seule vraiment efficace est la chirurgie des mâchoires (ostéotomie d'avancée bi-maxillaire) qui ne peut être proposée qu'à un très faible nombre de patients (moins de 1 %). L'objet de cette étude est de valider qu'il est possible d'implanter un dispositif de rigidification et réorientation à la base de la langue, pour réduire l'incidence des apnées obstructives, tout en préservant le confort du patient.

Ces études nécessitent de recourir à des modèles d'animaux vivants car nous souhaitons évaluer la stabilité et l'innocuité du dispositif médical en tenant compte de tous les mouvements naturels. Le modèle porc a été retenu car la proximité anatomique des structures linguales du porc avec celles de l'humain fait de cet animal un bon support expérimental. Aucune méthode alternative n'est disponible à l'heure actuelle pour ce type d'étude. Ces études vont nécessiter de travailler sur un maximum 10 porcs, nombre maximal d'animaux envisagés sur plusieurs sessions étalées sur 5 ans. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des porcs, en limitant leur stress par un hébergement en groupes sociaux. Les porcs seront manipulés, soignés, et suivis par du personnel compétent, spécialement formé à l'évaluation des signes cliniques du porc.

6540. De nos jours, les techniques de transfert embryonnaire sont largement utilisées dans la filière bovine pour l'amélioration du progrès génétique. Ces techniques qui consistent à produire plusieurs embryons simultanément chez une femelle donneuse à haute valeur génétique pour les transférer dans l'utérus de femelles receveuses, de moindre valeur, jouant le rôle de mère porteuse. Pour être efficaces, ces techniques nécessitent la production d'embryons en nombre et en qualité suffisante pour maximiser le nombre de descendants. Aujourd'hui, la production d'embryons viables est encore très variable chez les donneuses d'embryons. Grâce aux nouveaux outils de lecture du génome, deux populations d'animaux extrêmes ont été mises en évidence : les femelles porteuses du variant favorable à la production d'embryons et celles non porteuses. La caractérisation et la meilleure compréhension des mécanismes de réponse aux traitements hormonaux nécessaires à la production d'embryons entre ces deux populations permettront de valider les approches génétiques et de mieux sélectionner les donneuses. Ainsi, huit génisses Holstein (2 lots expérimentaux : 4 femelles porteuses du variant favorable et 4 femelles non porteuses du variant favorable) feront l'objet d'une étude fine en station expérimentale en deux temps. Dans un premier temps, un suivi échographique et hormonal fin de 3 cycles œstraux sera réalisé puis, dans un 2nd temps, une série de 6 collectes d'ovocytes sera effectuée après traitement de superovulation des femelles afin d'étudier et comparer leur réponse aux traitements hormonaux. Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* n'étant à ce jour disponible concernant le modèle génétique cité ci-dessus, le recours à l'animal est nécessaire.

Réduction : le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés pour garantir une approche statistiquement valable tout en conservant un minimum de variabilité individuelle.

Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance continue (activité, rumination) et hébergées dans une stabulation récente répondant aux enjeux du bien-être animal chez cette espèce (10 m<sup>2</sup> 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.

6541. Le tube digestif est colonisé par un ensemble de micro-organismes, appelé microbiote intestinal. L'étude de l'incidence de cet écosystème sur la santé humaine est devenue un domaine de recherche majeur. Cette communauté microbienne est impliquée dans la régulation de plusieurs voies métaboliques de l'hôte, donnant lieu à d'importants axes d'interactions hôte-microbiote : métabolique, de signalisation, et immunitaire/inflammatoire. Bien que le lien de causalité ne soit pas encore clairement établi, il est montré que la composition du microbiote diffère chez des personnes obèses ou des patients diabétiques comparativement à des sujets contrôles. La métabolomique est l'étude de l'ensemble des métabolites (petites molécules) présents dans une matrice biologique donnée (plasma, urine, contenus intestinaux, organes, cellules). Cette approche permet de définir l'état fonctionnel et dynamique des interactions hôte-microbiote. Notre objectif est d'étudier les interactions entre le microbiote et l'aliment et leurs effets sur l'hôte.

Nous travaillerons sur la souris, qui constitue une espèce de référence pour ce type de travaux. Nous estimons que nous utiliserons 40 animaux par an, soit un total de 200 animaux sur la durée du projet. Dans le cadre de notre projet, nous étudierons l'effet de

régimes alimentaires, comparables à ceux consommés chez l'homme, sur le microbiote intestinal et le profil métabolomique de l'hôte. Ainsi les animaux seront nourris avec un régime enrichi en lipides, en protéines ou comprenant des teneurs différentes en fibres alimentaires, en comparaison de régimes témoin. L'alimentation sera donnée à des animaux adultes sur 4 semaines. Le profil métabolomique sera analysé au niveau des contenus intestinaux, plasmatiques et urinaires.

Dans une volonté de maximiser le respect de la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser au maximum les expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Cependant, l'étude de ces écosystèmes impose le modèle animal (en l'occurrence murin) pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle *in vitro* récapitulant tous les paramètres du tube digestif. Nos groupes de souris seront réduits à 8 animaux car un nombre inférieur ne permettrait pas d'obtenir des résultats statistiquement significatifs étant donné la variabilité de ces expérimentations animales. Les animaux bénéficient également d'un enrichissement de leur milieu (type feuille de cellulose, permettant une diminution du stress potentiel et la réalisation de petits nids par les animaux). L'hébergement des animaux se fait de façon standard, dans des cages avec litière avec accès à l'eau et à l'aliment à volonté. Quatre animaux maximum sont hébergés par cage. Notre protocole consistant à nourrir les animaux avec un régime moyennement riche en graisse, équivalent à celui donné chez l'homme, aucune mortalité n'est attendue au cours de ce régime. Enfin, les conditions d'euthanasie sont clairement définies. Le projet se déroulera sur une période de 5 ans.

6542. La majorité des maladies cardiovasculaires est causée par des facteurs de risques tels que l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'obésité, l'âge ou encore le diabète. Ces facteurs de risques retrouvés chez le même individu ont un effet synergique, augmentent le risque cardiovasculaire et définissent ce que l'on appelle le syndrome métabolique. Aux Etats-Unis par exemple, 23% de la population générale présenterait un syndrome métabolique.

Dans le cadre de nos recherches visant à améliorer le traitement des maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde ou encore l'insuffisance cardiaque, le recours aux études sur l'animal est indispensable. Les candidats médicaments sont choisis à l'issue de séries d'études *in vitro* démontrant leur puissance et leur sélectivité sur les cibles sélectionnées. Leur efficacité va ensuite être démontrée dans des modèles physiopathologiques reproduisant au plus juste la pathologie humaine. Ainsi, bien que l'efficacité d'un produit puisse être appréhendée au moyen de tests *in vitro*, il est nécessaire après cette première sélection d'avoir recours à l'animal pour discriminer et caractériser de façon certaine les produits candidats, futurs médicaments.

Dans ce projet de recherche, nous souhaitons ainsi développer un nouveau modèle préclinique d'insuffisance cardiaque sur l'espèce porc présentant différents facteurs de risques cardiovasculaires (obésité, dyslipidémie, hypertension, diabète...). Les facteurs de risques seront générés par une alimentation avec un régime enrichi en graisse, sucre et sel. Un infarctus du myocarde sera induit chez ces porcs évoluant dans ce contexte de facteurs de risques à l'installation de l'insuffisance cardiaque.

La mesure de la glycémie et du cholestérol ainsi que des mesures physiologiques telles que la pression artérielle et la fréquence cardiaque seront évaluées à intervalles réguliers afin d'évaluer dans un premier temps la pertinence de ce modèle puis ensuite l'efficacité de candidats médicaments au cours de l'évolution vers l'insuffisance cardiaque.

Ce modèle a pour objectif de permettre d'évaluer avec une plus grande prédictivité le potentiel thérapeutique des molécules sur cette pathologie cardiaque tout en tenant compte du contexte médical des futurs patients qu'ils cibleront, incluant les facteurs de risques (obésité, diabète, hypertension, ...) ainsi que les traitements qu'ils peuvent recevoir.

Le porc qui présente un système digestif, métabolique et cardiovasculaire proche de l'Homme, est une espèce déterminante dans l'évaluation d'un futur candidat médicament.

Tout au long de la mise en place du modèle pathologique, les animaux feront l'objet d'un suivi et d'une surveillance spécifique par les expérimentateurs et le personnel de zootechnie qui assure les soins aux animaux.

La phase chirurgicale nécessaire à l'induction de l'infarctus du myocarde sera couverte par une anesthésie, une analgésie post-opératoire ainsi qu'une surveillance dédiée. Les porcs recevront les traitements ad hoc classiquement administrés en médecine vétérinaire et humaine (diurétiques, inhibiteur d'enzyme de conversion) en cas d'apparition des signes cliniques associés à l'installation de l'insuffisance cardiaque, afin de limiter l'inconfort lié à leur état pathologique. Si toutefois un des points limites prédéfinis devait être atteint, les porcs seraient systématiquement soustraits des études.

Le suivi longitudinal de chaque individu permettra de suivre la progression de la maladie en limitant le nombre d'animaux utilisés. Nous prévoyons de mettre en œuvre ce type d'étude 1 fois par an, ce qui représente 30 porcs par an, soit 150 porcs maximum sur 5 ans.

Ils seront hébergés dans des boxes pourvus d'enrichissements du milieu tels que balles, chaînettes, ou encore sur une litière de copeaux de bois pour plus de confort. Des croquettes seront dispersées dedans afin de stimuler leur instinct de fouissage.

6543. Le psoriasis est une maladie inflammatoire touchant 3-4% de la population générale, qui constitue un véritable problème de santé publique et impacte fortement la qualité de vie du patient. L'évaluation de la sévérité clinique du psoriasis repose sur l'établissement du score de gravité PASI (Psoriasis Area Severity Index) et conditionne la prise en charge thérapeutique des patients. Ce score est actuellement calculé à partir de l'observation clinique par le praticien et n'est pas satisfaisant sur le plan de la prise en charge du patient qui s'avère trop aléatoire et non ajustée sur le plan thérapeutique. Dans ce projet, nous proposons d'explorer la possibilité d'utiliser les techniques d'imagerie pour mesurer ce score et garantir la répétabilité. Dans ce cadre, un nouveau procédé est en cours de développement permettant d'extraire les caractéristiques physiques liées aux pathologies inflammatoires cutanées. Une phase d'expérimentation animale est nécessaire pour le développement de la technique avant d'envisager une adaptation du système d'acquisition à la clinique humaine. La mise au point des techniques d'acquisition d'images et de leur traitement (développement d'algorithmes pour l'analyse des images) est donc envisagée à partir d'un modèle d'inflammation cutanée



psoriasiforme chez la souris par application topique d'imiquimod (crème Aldara 5%) pendant 6 jours. En ce qui concerne le respect de la règle des 3R, le choix du modèle murin permet d'obtenir des peaux inflammatoires d'intensités calibrées et évite le recours à un modèle d'inflammation cutanée chez le primate, plus proche de l'homme. Un nombre réduit de 10 animaux sera suffisant pour paramétrer les conditions d'acquisition des images de peaux inflammatoires puis 5 séries d'acquisition de 7 animaux par série (1 animal /point de cinétique de J0 à J6) seront nécessaires à la constitution d'une base de données pour le développement des algorithmes de détermination des scores de sévérité clinique. Un total de 45 animaux sera utilisé pour réaliser cette étude. Afin de réduire au maximum le stress de l'animal et la pénibilité des expériences (rasage/épilation du dos et acquisition des images nécessitant l'immobilité des animaux), une anesthésie des animaux sera effectuée.

6544. Enormément d'études en neurobiologie utilisent des souris pour tester des substances ou comprendre les mécanismes cérébraux, notamment grâce à des tests comportementaux. Mais si la souris est largement utilisée dans des conditions d'hébergement standards et dans des paradigmes comportementaux tout aussi standards, nous ne savons quasiment rien sur la vie des souris dans un environnement plus proche de leur habitat naturel, un environnement qui leur permettrait d'exprimer une grande partie, sinon l'intégralité de leur répertoire comportemental. Connaître ce répertoire comportemental plus complet nous permettra de mieux comprendre ce modèle largement utilisé et donc, par la suite, de raffiner les tests comportementaux classiques pour caractériser plus finement les aspects développés dans les différentes études.

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

6545. Le sepsis sévère et le choc septique restent la cause première de mortalité intra-hospitalière. Un traitement antibiotique précoce associé à des soins de soutien est essentiel pour contrôler l'infection, mais sont souvent insuffisants pour éviter une issue fatale. Récemment, il a été montré que la survie du patient à l'infection dépend de la résistance de celui-ci (sa capacité à diminuer la charge de l'agent pathogène) et de sa tolérance (capacité à diminuer l'amplitude de la réponse inflammatoire et/ou son impact négatif sur les tissus, sans cibler directement les agents pathogènes). Une étude récente a confirmé que l'amélioration de la tolérance des tissus aux dommages engendrés par le sepsis pourrait être une option thérapeutique complémentaire prometteuse dans cette pathologie mortelle.

De nombreuses études ont souligné le rôle de signaux de danger dans l'induction/ maintien de cette inflammation. Ces signaux de danger sont des molécules libérées par les cellules mortes et détectées par les cellules immunitaires et non immunitaires de l'hôte. Lorsque trop relâchées, ce qui se produit dans le sepsis sévère, ces molécules sont délétères pour l'hôte. Parmi ces molécules, les histones ont été décrites comme étant responsables d'effets dévastateurs. Chez les patients septiques, les concentrations plasmatiques d'histones sont en corrélation avec l'activité de la maladie et la gravité. Par conséquent, les histones extracellulaires représentent des cibles thérapeutiques pour le traitement du sepsis. Ainsi, leur inactivation par des anticorps anti-histones, de l'héparine ou de la protéine C activée inhibe les activités pro-inflammatoires et pro-thrombotique et réduit la mortalité dans des modèles d'inflammation stérile et de sepsis.

Nous avons identifié une protéine plasmatique (X) sécrétée suite à une inflammation, se fixant sur les histones et empêchant ainsi leur action délétère. Cette protéine X, dosée chez les patients atteints de sepsis, est en plus grande quantité chez les patients survivant comparée aux patients décédant d'un sepsis. Notre projet a pour objectif de déterminer l'implication de X dans la physiopathologie du sepsis et son rôle protecteur potentiel. Pour ce faire, nous aimerions suivre l'implication de notre protéine X dans un modèle *in vivo* de sepsis, l'utilisation des animaux est donc indispensable. Le but de cette expérimentation animale chez la souris est d'apporter des preuves de l'importance de X dans la survie au sepsis. Pour cela, nous allons induire un sepsis chez 42 souris C57BL/6J sauvages et 42 souris C57BL/6J déficientes en protéine X, puis nous induirons de nouveau le sepsis dans 30 souris C57BL/6J sauvages et les compléterons avec la protéine X en comparaison à 30 souris sauvages non complémentées. Ce qui représente un total de 144 souris. Suite à l'induction du sepsis, les souris seront suivies bi-quotidiennement. Pour éviter la souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, comportement/mouvement, évolution pondérale) seront évalués quotidiennement et constitueront suivant un score les points limites de l'expérience. Notre

démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R : remplacement des animaux par des expériences *in vitro* préalablement réalisées ayant montré l'implication de cette protéine dans la protection cellulaire contre les histones), réduction du nombre d'animaux par l'utilisation du nombre minimum permettant des statistiques fiables, et raffinement du protocole expérimental, pour éviter le stress des animaux de la musique est mise dans la pièce de stabulation, des petites maisonnettes sont présentes dans les cages pour enrichir le milieu. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises des bonnes pratiques de laboratoire.

6546. Nous avons développé un vaccin thérapeutique cellulaire composé d'une lignée de cellules dendritiques plasmacytoïdes pDC, irradiée et chargée avec des peptides tumoraux. Ce vaccin (pDCVax) a fait l'objet d'un essai clinique de phase 1 visant à évaluer son innocuité. L'étape suivante, tenant compte des nouvelles thérapeutiques dans le mélanome, est de combiner pDCVax avec un anticorps monoclonal ciblant PD-1 (anti-PD-1 mAb). Nous avons montré *in vitro* que l'association de ces 2 immunothérapies complémentaires synergise fortement. Afin d'aller plus loin dans la démonstration, nous devons étudier cette synergie dans un modèle préclinique *in vivo*. Ce projet vise donc à évaluer dans un modèle préclinique de souris humanisées l'utilisation de pDCVax en combinaison avec l'anti-PD-1. Le traitement du mélanome reste la première indication, mais les résultats obtenus pourront être étendus par la suite à tout type de cancer (en chargeant la lignée avec des peptides caractéristiques d'un autre type de cancer). Nous évaluerons ainsi le potentiel thérapeutique de pDCVax en combinaison avec les anti-PD-1 *in vivo* dans des souris immunodéficientes (souche NSG) reconstituées avec un système immunitaire humain et xénotransplantées avec différentes lignées humaines de mélanome.

Ce projet se découpe donc en 7 étapes, nécessaires et suffisantes pour valider notre stratégie d'immunothérapie combinée :

- 1- Elevage des souris NSG
- 2- Mise au point du modèle (optimiser les paramètres d'humanisation, d'implantation des tumeurs humaines)
- 3- Détermination de la bio-distribution et la longévité *in vivo* de pDCVax (grade clinique) en fonction de la voie d'injection (ip, sc, iv)
- 4- Évaluation de la capacité de pDCVax à induire une bonne immunisation en fonction de la voie d'injection
- 5- Évaluation de l'efficacité anti-tumorale induite par pDCVax en testant différentes voies d'injections.
- 6- Évaluation de l'efficacité anti-tumorale induite par pDCVax en combinaison avec l'anti-PD-1
- 7- Caractériser la réponse immunitaire induite par pDCVax en combinaison avec l'anti-PD-1.

Ce projet nécessite l'utilisation de 360 souris. Lors de la conception de ce projet, nous avons essayé de limiter au maximum le nombre d'animaux par groupe et le nombre de groupes. Nous avons également cherché à optimiser les expériences pour obtenir un maximum de réponses tout en utilisant un minimum d'animaux. Le nombre de souris par groupe ne peut être d'avantage réduit, afin de permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. Les procédures utilisées dans ce projet sont classées en tant que procédures légères. Elles ne devraient pas infliger de stress ou douleur particulière aux animaux. Toutefois le bien-être des animaux sera monitoré durant toute la durée des expériences, à travers le suivi de poids, d'aspect et de comportement des animaux.

6547. Dans l'industrie électro-nucléaire, la manipulation par des travailleurs d'éléments radioactifs comme les actinides, émetteurs de rayonnements alpha tels le plutonium ou l'américium, constitue un risque de contamination interne. Bien que peu d'accidents de contamination interne surviennent chaque année, l'approche médicale actuelle vise à limiter la dose radiologique délivrée aux tissus de l'organisme. Depuis de nombreuses années, notre laboratoire étudie la radiotoxicité de ces éléments, essentiellement chez le rongeur. La mise au point d'un traitement consiste à stimuler la décorporation (évacuation du corps) de ces éléments en traitant la personne contaminée avec un agent chélateur DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique), seule molécule recommandée et disposant de l'AMM (autorisation de mise sur le marché) à ce jour. Cette approche thérapeutique vise à limiter la rétention de l'actinide et à augmenter son excrétion. Malheureusement, cet agent décorporant présente une efficacité limitée liée notamment à sa période biologique courte et sa biodisponibilité intracellulaire faible. L'efficacité de décorporation par le DTPA pourrait être améliorée par une nouvelle forme galénique pour qu'il cible préférentiellement les principaux tissus de rétention des actinides, et/ou pour prolonger sa période biologique. En plus de cette approche « décorporant », nous allons également étudier les effets physiopathologiques induits par une contamination pulmonaire par le plutonium moyennement soluble.

Nos études permettront de définir des protocoles de traitements décorporants par le DTPA plus efficaces et adaptés aux scénarios de contamination interne pour les travailleurs du nucléaire. Ils permettront également de déterminer le bénéfice d'autres traitements combinés au DTPA.

Ce projet ne peut pas être réalisé sur des modèles cellulaires, les actinides étant retenus par différents organes cibles (os, foie). De plus, la rétention peut varier selon la nature physico-chimique du contaminant et des approches thérapeutiques choisies.

Ce projet utilisera 1164 rongeurs, espèce pour laquelle le laboratoire possède de nombreuses données expérimentales après contamination par des actinides (métaux lourds appartenant à une série de 15 espèces chimiques tous radioactifs), ce qui nous permet de faire des comparaisons et de limiter au maximum le nombre d'animaux nécessaire. Ce nombre a été calculé au plus juste et déterminé en fonction des quatre procédures expérimentales de traitement à tester pour quatre contaminants différents (plutonium sous la forme soluble, moyennement soluble, ou colloïdale, et américium). Tous les animaux proviennent d'élevages agréés et prévus pour l'expérimentation.

Les modes opératoires de cette étude ont été réfléchis de manière à engendrer le moins de souffrance possible aux animaux. Toutes les injections sont faites sous anesthésie. L'observation quotidienne des animaux par les zootechniciens mais aussi par les expérimentateurs permet d'administrer des traitements antalgiques adaptés dès la survenue de problèmes.

Pour pallier des effets non attendus, des critères d'arrêt ont été prévus. Une attention particulière est portée sur la mise en place d'un enrichissement adapté, dans la cage d'hébergement des animaux de façon à améliorer leur cadre de vie tout au long de l'étude.

6548. Les pneumonies, notamment liées à une association de bactéries et de virus appelée complexe respiratoire murin, sont très fréquentes chez le rat de compagnie. Les nébulisations sont fréquemment employées à des fins de traitement. Ainsi, diverses molécules peuvent être utilisées, telles que des antibiotiques, des mucolytiques, ou simplement de la solution physiologique concentrée permettant de fluidifier les sécrétions.

Aucune information n'est actuellement disponible quant à la diffusion des substances nébulisées dans les poumons des rats, ou quant au temps de nébulisation nécessaire afin que ces molécules atteignent les poumons. Ce projet de recherche a pour but de déterminer s'il est possible pour les substances nébulisées d'atteindre l'ensemble de l'arbre pulmonaire, ainsi que le temps de nébulisation nécessaire pour ce faire. Ceci permettra de s'assurer que des soins de qualité sont apportés aux animaux traités, et potentiellement de limiter les risques d'antibiorésistance pouvant se développer suite à des concentrations en antibiotiques insuffisantes dans les poumons.

Nous envisageons de tester 4 durées de nébulisation sur le rat vigile placé dans une chambre d'induction où il inhalera spontanément des gouttelettes de sérum physiologique supplémenté en fluorescéine, un colorant vital couramment utilisé en médecine. Nous estimons qu'un nombre de 10 animaux par groupe nous permettra de comparer les durées d'exposition de manière suffisante. Ce projet inclura donc un maximum de 40 animaux.

La validation de méthodes thérapeutiques dans l'espèce cible ne peut être remplacée par d'autres méthodes. Notre expérience clinique avec des animaux de la même espèce montre que l'inhalation de substances dans les conditions de ce projet ne génère pas d'inconfort chez l'animal (raffinement). Si au cours de l'étude préliminaire il s'avère que les résultats de certaines durées d'exposition sont inexploitable (en dehors de la gamme de sensibilité), les groupes correspondant ne seront pas étudiés dans la seconde phase de l'étude (réduction).

6549. Le syndrome de la défaillance multiviscérale, fréquemment rencontré en réanimation, est caractérisé par la décompensation simultanée ou consécutive d'au moins deux organes. C'est la conséquence ultime d'un grand nombre d'affections médicales ou chirurgicales entraînant des lésions tissulaires, comme le choc septique, le polytraumatisme, l'arrêt cardiaque réanimé, ou les suites d'interventions chirurgicales cardiovasculaires ou digestives majeures. Plus de la moitié des patients atteints de ce syndrome décèdent à l'heure actuelle. Toutefois, sa prise en charge est actuellement limitée au soutien pharmacologique ou mécanique des organes sans traitement de la cause sous-jacente. Ainsi, la recherche expérimentale reste nécessaire afin de réduire ou prévenir les dysfonctions d'organe lors de la défaillance multiviscérale.

Dans ce projet, nous proposons d'étudier l'effet d'une nouvelle approche thérapeutique dans une situation de défaillance multiviscérale d'origine ischémique avec l'administration d'un gaz rare : l'Argon (Ar). En effet, l'Argon a montré une capacité de protection contre les séquelles cérébrales d'un arrêt cardiaque ou d'un accident vasculaire cérébral. Nous proposons d'évaluer s'il peut aussi protéger les organes et l'ensemble de l'organisme après une ischémie-reperfusion abdominale.

Dans ce but, nous utiliserons un modèle original de défaillance multiviscérale par clampage de l'aorte supra-cœliaque chez le lapin. Ce modèle a été développé par l'équipe d'accueil qui a acquis une expertise particulière dans la recherche sur l'état de choc et ses conséquences. Afin d'évaluer la fenêtre de protection de l'Argon, différents temps d'inhalation au cours de l'agression ischémique seront étudiés. Nous proposons d'étudier 4 groupes expérimentaux de 10 animaux chacun auquel il faudra ajouter environ 5 animaux pour cause d'échec chirurgical ou expérimental. Cette situation ne peut pas être mimée *in vitro* et il n'existe aucune méthode alternative (absence de Remplacement possible). Les agressions ischémiques systémiques sont en effet des situations complexes impliquant de nombreuses interactions multiviscérales. Nous avons calculé statistiquement le nombre d'animaux nécessaire pour pouvoir mettre en évidence un éventuel effet, tout en réduisant autant que possible l'usage d'animaux (Réduction). Chaque expérience sera valorisée au maximum au travers d'analyses complémentaires et les animaux seront sous anesthésie générale pendant toute la procédure (Raffinement).

6550. Notre projet vise à caractériser l'implication de l'Octadecaneuropeptide (ODN) dans la régulation cérébrale de la prise alimentaire, de l'homeostasie glucidique et des dépenses énergétiques, ainsi que son potentiel dans le traitement de l'obésité induite par un régime enrichi en graisses. L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution *in vitro* n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude des effets de l'ODN sur le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. Les questions posées nécessitent des souris de trois génotypes différents. 1) des souris sauvages C57BL/6, soumises à une alimentation standard ou enrichie en graisses (high fat diet HFD); 2) des souris génétiquement modifiées exprimant la Green Fluorescent Protein (GFP) dans les neurones à proopiomelanocortine (POMC); et 3) des souris Ob/Ob porteuses d'une mutation rendant l'hormone adipocytaire leptine non fonctionnelle. Pour l'ensemble des souris utilisées, l'administration d'ODN, de son agoniste octapeptide (OP) ou de son antagoniste Cyclo-L-OP sera réalisée par voie intracérébroventriculaire (icv) dans le ventricule latéral. La chirurgie d'implantation de canule icv sera réalisée sous anesthésie générale, avec un traitement antalgique et anti-inflammatoire au Rimadyl en pré- et post-opératoire. Par ailleurs des rats seront utilisés pour une administration icv au niveau du 3ème ou du 4ème ventricule afin de cibler plus précisément les régions cérébrales impliquées. La présence d'une canule chronique rend indispensable le maintien post-opératoire des animaux en cage individuelle pour éviter toute blessure. Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse liée à cet isolement social, les animaux seront placés en cages transparentes disposées côte à côte de sorte à permettre les contacts visuels et olfactifs entre congénères. Comme lors de

l'hébergement en cage collective, le milieu sera également enrichi (Cellulose Diamond Twist, Harlan). Par ailleurs, l'évaluation de la souffrance sera basée sur un suivi journalier (attitude corporelle, aspect du pelage, examen de la suture, poids corporel) ainsi qu'un suivi bi-hebdomadaire de la prise alimentaire de sorte à administrer un traitement anti-inflammatoire/antalgique supplémentaire, ou sortir un animal de l'étude si nécessaire. Le projet est basé sur : 1) des procédures expérimentales peu invasives sur animal vigile et 2) des prélèvements et dosages après mise à mort. Le niveau de souffrance qui résulte de ces procédures est par conséquent léger à modéré. Les procédures expérimentales qui seront menées dans le cadre de ce projet ont été conçues à partir des résultats obtenus lors d'études antérieures menées au laboratoire ce qui permet de définir le nombre d'animaux nécessaires au plus juste. Ainsi, l'étude portera sur un total de 854 animaux : 60 rats mâles Wistar, 258 souris mâles réparties comme suit en fonction de leur génotype (154 C57BL/6 ; 32 POMC-GFP ; 72 Ob/Ob); il est à noter que l'élevage des souris POMC-GFP et Ob/Ob aboutira également à la production de femelles (32 POMC-GFP et 288 Ob/Ob) et de mâles de génotype non appropriés (216 Ob/Ob) qui seront euthanasiés au CO<sub>2</sub>.

6551. Le rôle des acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 a considérablement augmenté ces dernières années, en particulier dans les processus inflammatoires en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires. L'inflammation est une réponse protectrice de l'organisme visant à contrôler l'infection et à favoriser la réparation des tissus. Cependant, une inflammation excessive peut avoir de graves conséquences au niveau des tissus, dont le cerveau et peut entraîner des maladies de type neurodégénératives. Une part des actions bénéfiques des AGPI n-3 dans des modèles d'inflammation en périphérie est attribuée à la synthèse de médiateurs lipidiques spécialisés tels que les résolvines et neuroprotectines, qui participent activement à réduire la réponse inflammatoire. Nous avons constaté *in vitro* que ces molécules avaient des propriétés anti-inflammatoires dans les cellules microgliales, cellules immunitaires du système nerveux central.

Nous soumettons ici l'hypothèse que les médiateurs lipidiques dérivant des AGPI n-3 sont impliqués dans la résolution de l'inflammation cérébrale. Cette étude permettrait de mettre en évidence une nouvelle génération de médiateurs lipidiques pouvant prévenir ou combattre les altérations liées à une neuroinflammation. Pour tester cette hypothèse nous utiliserons une approche pharmacologique, impliquant la mise au point d'un modèle d'administration intracérébroventriculaire de médiateurs lipidiques dérivés des AGPI n-3, et une approche nutritionnelle sur le rongeur. Des expériences *in vitro* ont permis de valider l'efficacité des métabolites des AGPI n-3 cependant la complexité de l'organisme vivant et notamment du cerveau ne peut pas être remplacée car les éléments à reproduire sont trop difficiles à modéliser. L'utilisation de l'animal se justifie alors afin d'obtenir des résultats fiables. Nous estimons le nombre total de souris à utiliser dans ce projet à 840 animaux sur 3 ans d'expérimentation. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous avons limité le nombre de molécules à tester et nous avons restreint le n à 5 dans certaines expériences qui de par leur robustesse nous permettent de garantir la validité scientifique et statistique. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte quotidiennement par le personnel de l'animalerie de leur arrivée à leur mort pour détecter d'éventuels signes de souffrance. Afin de limiter l'inconfort de l'animal lors des chirurgies, nous donnerons des soins pré, per et post opératoires et nous aurons recours aux analgésiques. Des points limites prédictifs ont été définis pour limiter la souffrance de l'animal. Les critères utilisés sont ceux de Lloyd *et al.* (*Lab Animal*, 1998). De plus, nous avons fait le choix d'étudier des situations aiguës plutôt que chroniques. Enfin, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (cage collective et/ou carré de coton).

6552. *Streptococcus agalactiae* (streptocoque du groupe B, SGB) est une bactérie capsulée à Gram positif, commensale des voies digestives et vaginales, retrouvée chez 20 à 30 % des adultes sains. A ce constat, s'ajoute un risque accru de contracter *Streptococcus agalactiae* chez les patients immunodéprimés et atteints de diabète. Par l'intermédiaire de l'inhalation ou l'ingestion du liquide amniotique, *S. agalactiae* est la première cause d'infections néonatales invasives (septicémies, méningites) avec deux syndromes décrits : l'infection précoce qui se développe durant la première semaine de vie et l'infection tardive qui apparaît de 7 jours à 3 mois après la naissance.

Depuis la mise en place d'une antibioprophylaxie au moment de l'accouchement chez les femmes colonisées, le nombre d'infections précoces a diminué. Cependant, le nombre d'infections tardives reste stable. Il existe une forte association entre le syndrome tardif et les souches de sérotype capsulaire III et de séquence type 17. Le clone ST-17, qui a ainsi été désigné « hyper-virulent », possède des facteurs de virulence spécifiques pouvant expliquer son hyperpathogénicité chez les nouveau-nés et son tropisme pour le système nerveux central.

Le microbiote se compose d'une multitude de microorganismes dont la coexistence avec l'épithélium conditionne la fonctionnalité même de notre réponse immunitaire contre une infection intestinale bactérienne. Cependant, les facteurs par lesquels l'interaction de l'hôte avec la flore intestinale conditionne le potentiel invasif et la virulence de *S. agalactiae* restent encore connus.

Le projet a pour objet de comprendre les mécanismes par lesquels la flore intestinale, l'immunité adaptative et la réponse métabolique de l'hôte influencent la colonisation d'un pathogène humain majeur en appréhendant les stratégies développées par SGB pour s'implanter chez un hôte en déjouant les barrières intestinale, placentaire et hématoencéphalique. Pour l'étude du rôle des interactions de l'hôte avec le microbiote intestinal sur la virulence de SGB, il est nécessaire :

1. Caractériser les facteurs bactériens responsables de la colonisation et la dissémination chez le nouveau-né.
2. Déterminer si et comment la flore intestinale influence la colonisation du clone SGB 'CC17' chez le nouveau-né.
3. Déterminer si et comment la réponse immunitaire adaptative maternelle module la transmission de SGB aux nouveau-nés.
4. Evaluer le potentiel de transmission de SGB aux nouveau-nés dans un modèle préclinique de diabète de type 2 induit par une consommation hyper-calorique chez la souris.

Afin d'évaluer les réponses de l'hôte à SGB, des modèles murins invalidés pour des protéines ayant des rôles dans la réponse immunitaire adaptative seront utilisés. Les expériences de ce projet, mettant en jeu un agent infectieux de classe 2, impliqueront un maximum de 3072 souriceaux, 512 femelles adultes et 104 mâles adultes et seront effectuées dans l'animalerie. Seul le personnel formé et habilité à travailler en confinement de classe 2 réalisera ces expériences. Il est à noter aussi que préalablement aux expériences sur animaux, des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de définir les méthodes de raffinement (mode d'infection par voie naturelle orogastrique et vaginale) et de réduction (par une analyse multiparamétrique sur chacun des nouveau-nés).

Outre ces aspects fondamentaux, les retombées de ce projet permettraient l'identification de biomarqueurs (dérivées de la flore intestinale, du système immunitaire adaptatif et/ou de la réponse métabolique) permettant de dépister les nouveau-nés à risque d'infection et le développement de nouveaux traitements.

6553. Une des hypothèses pouvant expliquer l'hypersensibilité électromagnétique (EHS) serait un dérèglement du système immunitaire. Ce dernier rendrait l'organisme hypersensible aux champs électromagnétiques (CEM) suite à un mécanisme initié par une exposition à une contrainte environnementale autre que les CEM. Ainsi, l'origine de l'EHS serait due à une multi-exposition provoquant une perte de sa capacité normale d'adaptation et de son immunotolérance. Plus récemment, il a été montré qu'une multi-exposition associant une contrainte thermique modérée et des CEM entraînaient une perturbation du sommeil et le maintien d'une vasoconstriction périphérique inadaptée sur le plan du maintien de l'homéothermie, ceci n'étant pas observé dans le cas d'une exposition seule aux CEM. Dans ce contexte, il se pourrait qu'une multi-exposition à des contraintes environnementales (situation commune pour la population) puisse être à l'origine d'une modification de la réponse immunitaire et donc d'une hypersensibilité. Parmi les contraintes environnementales, le bruit est fréquemment rapporté comme nuisance par la population. Par ailleurs, il a été montré que le bruit induisait des perturbations du sommeil également à l'origine de perturbations du système immunitaire. L'objectif de ce projet est de montrer si l'association d'une exposition aux CEM avec le bruit pourrait être à l'origine d'une perturbation du système immunitaire rendant l'organisme hypersensible aux CEM. En effet, la potentialisation des effets par la multi-exposition pourrait être à l'origine de la diversité des résultats rapportés dans la littérature sur les effets de l'exposition aux CEM. Ce projet permettra d'aborder la sévérité des modifications physiologiques consécutives à la multi-exposition et leurs implications dans le développement de l'EHS : s'agit-il de simples perturbations du sommeil traduisant une adaptation à un nouvel environnement ou bien des perturbations plus délétères avec des répercussions sur d'autres fonctions telles que le système immunitaire ou le système cardiovasculaire ?

Le recours au modèle animal est justifié par l'absence de méthodes alternatives pour les études physiologiques et comportementales. De plus, les interactions entre différentes fonctions physiologiques sont difficilement reproductibles avec un modèle *in vitro*. Les champs électromagnétiques peuvent produire une élévation de la température qu'un organisme vivant peut compenser par la mise en place de mécanismes et l'adaptation de certaines fonctions telle que le sommeil ou la prise alimentaire, contrairement à des cellules en culture. Pour ces différentes raisons, la réalisation de ce projet sera conditionnée par l'utilisation d'un modèle *in vivo* sur le rat de laboratoire. Le modèle d'étude sera le rat pour les raisons suivantes :

- il est un bon indicateur des effets éventuellement observés chez l'Homme de par la similitude des réponses physiologiques et comportementales mises en jeu lors de l'exposition à une contrainte.
- il s'agit d'un modèle de référence pour l'étude des systèmes neurophysiologiques (comme le sommeil) qui sont particulièrement bien référencés dans la littérature.

Les animaux seront hébergés dans des chambres climatiques au sein du laboratoire qui sont adaptées pour cette espèce et qui permettront de contrôler l'ensemble des facteurs environnementaux (photopériode, température ambiante, humidité, vitesse d'air, bruit et CEM). Ces chambres possèdent également des alarmes qui s'activent lors d'un défaut de l'un de ces paramètres. Tous les jours, le bien-être des animaux sera vérifié afin de s'assurer qu'un paramètre n'interfère pas avec les résultats.

Le nombre maximal de rats utilisés dans cette étude sera de 70 afin d'observer des résultats statistiquement significatifs. Il *in vitro* aura 4 groupes d'animaux exposés ou non aux CEM dont le sommeil sera perturbé ou non par le bruit. Chaque groupe d'animaux comptera 14 individus. Une étude préliminaire sera réalisée sur 14 animaux afin de valider le protocole de nuisances sonores avec 2 groupes exposés ou non au bruit composés de 7 animaux chacun.

6554. La fécondation chez les mammifères est un processus très sensible aux perturbations du métabolisme. De faibles variations de l'activité métabolique au cours des premiers stades de la fécondation peuvent orienter le développement embryonnaire ainsi que la croissance des animaux issus de ces différents embryons. Au moment de la fécondation, chez tous les mammifères, le calcium est le premier messager intracellulaire impliqué dans l'activation du métabolisme de l'œuf. Une fois déclenchée, la dynamique des signaux calciques provoque un ensemble de remaniements qui permet la mise en route du développement embryonnaire.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de l'élaboration du phénotype (ensemble des caractères observables) d'un individu dès le début de la fécondation. Nous comparerons les effets de différents milieux de culture utilisés en fécondation *in vitro* sur les taux de naissance et de croissance des animaux issus de ces embryons dans le but d'optimiser la composition de ces milieux. Nous étudierons les relations entre les différents milieux de culture et l'activité métabolique de l'œuf au moment de la fécondation ainsi que les conséquences à long terme chez l'adulte et proposerons une méthode de mesure quantitative de l'impact de ces différents milieux sur l'activité métabolique des embryons.

Pour évaluer l'effet des milieux de culture utilisés pour la fécondation *in vitro* sur l'activité métabolique de l'œuf au moment de la fécondation et sur son développement, nous injecterons des spermatozoïdes dans des ovocytes et nous les placerons dans différents milieux de culture. Nous enregistrons et analyserons les réponses calciques et nous établirons des corrélations avec les composants

de ces milieux de culture. D'autre part, nous transférerons des ovocytes fécondés *in vitro*, incubés en présence de ces milieux de culture, dans des femelles receveuses et nous étudierons la croissance des animaux obtenus.

Ce projet sera réalisé chez la souris et nécessitera l'utilisation de 1070 souris sur cinq ans. Seuls des animaux peuvent être utilisés pour établir des corrélations entre l'activité métabolique des œufs à la fécondation et les milieux de culture, et étudier les effets à long terme chez l'adulte. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes et avoir une bonne estimation statistique de la variabilité des réponses métaboliques. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance et limiter tout stress lors des interventions sur les animaux. Le suivi quotidien des animaux hébergés dans un environnement enrichi (papier de ouate) et l'application de critères d'arrêts de l'expérience permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance et de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie, en accord avec la cellule bien-être animal de l'installation expérimentale.

6555. Les patients en insuffisance cardiaque se répartissent actuellement pour moitié avec un défaut de contraction du cœur et pour l'autre moitié avec un défaut de remplissage du cœur. Notre projet porte sur ce dernier type d'insuffisance cardiaque qui concerne plus particulièrement les personnes âgées avec une prédominance chez la femme. Cette insuffisance cardiaque est souvent associée à d'autres pathologies comme l'hypertension artérielle et le diabète. Malheureusement, à ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique de cette pathologie et des études montrent que le pourcentage de personnes atteintes par cette maladie augmente de façon alarmante à raison de 1% par an comparativement à l'insuffisance cardiaque avec un défaut de contraction du cœur, ceci en raison notamment du vieillissement de la population. Il est donc urgent d'identifier les mécanismes cellulaires en cause dans cette pathologie afin de pouvoir développer de nouveaux médicaments ou utiliser des médicaments déjà disponibles pour d'autres pathologies. Une des raisons pour laquelle il n'existe pas de traitement s'explique par le peu de modèles animaux disponibles mimant cette pathologie.

Dans ce contexte, notre partenaire dans ce travail a développé un modèle de rat transgénique dont les caractéristiques cardiovasculaires sont proches de la pathologie humaine. Notre projet consiste donc à compléter sa caractérisation et notamment à essayer de comprendre pourquoi cette pathologie est plus développée par les femmes.

L'étude de la fonction cardiaque ne peut se passer d'une étude chez l'animal car les modèles cellulaires ne reflètent pas l'environnement neuro-hormonal présent physiologiquement, ni la fonction cardiaque dans son ensemble. Notre étude s'attachera à caractériser différents paramètres cardiaques grâce à l'imagerie du petit animal (TEP ou Tomographie à émission de Positons et SPECT ou Scintigraphie). Nous évaluerons ainsi différents paramètres chez le même animal réduisant ainsi drastiquement le nombre d'animaux mis en œuvre. Nous évaluerons plus particulièrement l'utilisation des sucres et graisses par le cœur. Les procédures d'imagerie utilisées dans ce travail permettent le raffinement car elles sont non-invasives (à l'exception de l'injection intraveineuse du produit) et se font sous anesthésie avec phase de réveil sous surveillance et lampe chauffante. Enfin,

Cette étude permettra d'envisager dans une future étude, une intervention correctrice par apport d'un régime particulier.

Pour cette étude nous comparerons des animaux transgéniques et leurs contrôles. Les animaux mâles et femelles seront étudiés. Chaque groupe comprendra 10 animaux, soit un total de 40 rats.

6556. L'hormone thyroïdienne est essentielle au développement du cerveau. L'hypothyroïdie au cours du développement induit un retard mental sévère et irréversible. Le défaut de signalisation thyroïdienne peut avoir différentes origines (manque d'hormone, mutation des récepteurs ou de transporteurs...), nécessitant des approches thérapeutiques adaptées. Cependant, les mécanismes d'action de l'hormone thyroïdienne au niveau du cerveau sont très mal connus, si bien que dans de nombreux cas, il n'existe pas à ce jour de traitement à proposer aux patients, même si la maladie est clairement identifiable au niveau génétique (syndrome d'Allan-Herndon-Dudley, résistance à l'hormone thyroïdienne liée aux récepteurs...). Il existe deux types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne, répartis dans tout l'organisme : alpha et beta. Les deux types de récepteurs sont présents dans le cerveau, mais leurs rôles respectifs ont été difficiles à évaluer jusqu'à présent en raison de la difficulté à séparer les effets centraux des effets périphériques de l'hormone. Pour surmonter cet obstacle, nous utilisons des lignées de souris permettant un ciblage spécifique des récepteurs alpha du cerveau. Ce projet porte sur des lignées pour lesquelles une mutation du récepteur alpha est exprimée dans les neurones GABAergiques, des neurones inhibiteurs essentiels à l'équilibre excitation/inhibition au sein du cerveau. L'objectif de cette étude est d'analyser, à plusieurs échelles, les conséquences induites par l'expression de cette mutation dans les neurones GABAergiques et de rechercher les mécanismes impliqués, notamment en termes de développement du système GABAergique.

Cette étude contribuera à progresser dans la compréhension des fonctions des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Elle repose sur des croisements de lignées de souris transgéniques. Compte tenu de la complexité du cerveau, des études *in vivo* sont nécessaires pour étudier le rôle de la signalisation thyroïdienne dans cet organe. Des études *in vitro* sont réalisées en parallèle, notamment pour aborder les aspects moléculaires de cette signalisation. Pour les expériences *in vivo*, nous travaillons avec des souris car actuellement c'est la seule espèce chez laquelle il existe des modèles ciblant l'expression de mutations des récepteurs de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau. Les procédures sur l'animal consisteront d'une part, en des observations comportementales dès les premières semaines de vie et d'autre part en des prélèvements de cerveaux pour analyses moléculaires et histologiques. Selon les analyses auxquelles il est destiné, le prélèvement de cerveau sera réalisé soit post mortem, soit sous anesthésie profonde et sans réveil, si bien qu'aucune souffrance animale n'est attendue lors de ce geste. Le nombre de souris indiqué est un nombre maximum, qui ne sera probablement pas atteint dans la mesure où nous arrêterons chaque procédure dès qu'un nombre d'observations suffisant aura été réalisé. Les souris seront suivies avec un soin particulier, afin de détecter précocement tout signe de souffrance. Ce projet concernera 1460 souris au maximum.

6557. La fièvre Q est une maladie répandue imputable à une bactérie, *Coxiella burnetii*, capable d'infecter les mammifères, les oiseaux, les reptiles et les arthropodes. Elle donne lieu à une forme atténuée chez les ruminants mais peut provoquer des avortements et une mortalité néonatale chez les bovins, les ovins et les caprins. Il s'agit d'une zoonose, c'est-à-dire une maladie d'origine animale pouvant se transmettre à l'homme. Le contrôle de la fièvre Q en élevage et des risques d'exposition humaine, passe par une meilleure connaissance de son épidémiologie ; d'une part, tout ce qui peut concerner l'identification des animaux porteurs et excréteurs de la bactérie (dépistage et détection précoce), la quantification de cette excrétion, les modalités d'excrétion du germe (moment de l'excrétion, durée, intensité par les voies vaginale, fécale et lactée), d'autre part, l'accumulation de données relatives à l'agent causal lui-même (caractérisation des souches, identification de facteurs de virulence, étude de la résistance, évaluation de la vaccination, évolution des souches) ; permettrait la mise en place de mesures prophylactiques et sanitaires plus appropriées.

Ce projet a pour but d'évaluer la virulence (pouvoir invasif) de souches appartenant à différents génotypes, isolées d'hôtes et d'origine géographique diverses afin de permettre une meilleure caractérisation des *C. burnetii*. Ceci aidera à développer ou cibler des outils pour l'identification de marqueurs génétiques liés à la virulence. Cette approche permettra également une identification et une évaluation plus rapide des risques infectieux liés aux souches de *C. burnetii* et donc de favoriser l'intervention et de suivre les mesures de gestion. Ce projet passe par l'inoculation des isolats de *C. burnetii*, via la voie sous cutanée plantaire, à des souris. La capacité des souches à passer la barrière du ganglion lymphatique poplité (ganglion lymphatique situé en arrière de l'articulation du genou) et à coloniser la rate est mesurée par la quantification de la charge de bactéries ayant colonisé ces deux organes. Les études de virulence de l'organisme ne sont réalisables que grâce à l'utilisation d'animaux hôtes, en effet, l'utilisation de systèmes *in vitro* à base de cellules reste limitée étant donné que la bactérie perd son pouvoir pathogène au bout de 5 passages. De plus, il a été mis en évidence une différence importante, dans le transcriptome (gènes différentiellement exprimés) de la bactérie, entre le modèle *in vivo* et des modèles de culture *in vitro*. En effet, *C. burnetii* met en jeu un sous-ensemble, seulement, de gènes de fonctions de base pour survivre dans des conditions *in vitro*, alors qu'elle requiert l'induction d'un répertoire plus complet de gènes pour se multiplier dans un environnement *in vivo* plus complexe.

Le nombre total d'animaux prévus pour les 3 ans de ce projet est de 455 souris. Il s'agit de jeunes souris mâles car, bien que sensibles à l'infection à *C. burnetii*, les jeunes animaux contrôlent mieux l'infection que les souris âgées. Les souris mâles sont plus sensibles que les souris femelles à l'infection de par l'effet protecteur des hormones femelles. Les souris sont hébergées dans des cages ventilées individuellement, garnies de litière en cellulose et enrichies de matériaux de construction de nid. Elles reçoivent, ad libitum, une alimentation et de l'eau potable stériles et sont hébergées en groupe. L'infection des animaux se déroule sur une période maximale de 10 jours. Il est à noter que, lors d'études antérieures utilisant ce modèle, aucun animal n'a présenté de complications avant la fin du protocole expérimental. Toutefois, une observation journalière est effectuée pour détecter tout signe de souffrance pouvant apparaître. Les animaux présentant, éventuellement, des signes d'inconfort ou de stress recevront un traitement pour réduire la douleur ou bien seront euthanasiés si les signes sont trop importants.

6558. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. Au cours d'études cliniques menées précédemment par le client sur des patients diabétiques, le composé X a présenté des effets bénéfiques inattendus sur la fonction cardiovasculaire. Deux mécanismes d'action semblent être responsables de ces effets cardiovasculaires :

- une amélioration de la distribution en oxygène au niveau des organes, notamment au niveau du cœur et des muscles.
- une utilisation accrue des corps cétoniques en tant que source énergétique, le composé X étant connu pour augmenter la production de corps cétoniques.

Ces effets laissent suggérer que le composé X puisse induire une amélioration des performances physiques (meilleure oxygénation des muscles associée à une oxydation accrue des corps cétoniques, ces derniers étant aujourd'hui utilisés comme dopants par les sportifs).

Cette hypothèse sera explorée par la présente étude sur un modèle de rats diabétiques (rats ZDF) soumis à de l'exercice physique sur tapis roulant. Elle visera ainsi à évaluer les effets du composé X au cours de tests physiques de performance et d'endurance. Ces tests seront réalisés chez des animaux nourris ou ayant été mis à jeun pendant une période modérée, ce dernier état étant connu pour potentialiser la production de corps cétoniques par le composé X.

Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mieux caractériser les effets physiologiques et de mieux comprendre les mécanismes d'action de leur composé.

Le présent projet consistera :

- à entraîner régulièrement les animaux à une course sur tapis roulant (intensité de l'activité modérée).
- A déterminer l'impact du traitement sur les performances physiques, la consommation en oxygène et le quotient respiratoire (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) aux cours de deux tests d'activité physique successifs, un test de performance (mesure de la consommation de VO<sub>2</sub> maximum de l'animal) et un test d'endurance. Ces tests seront effectués dans un système permettant de mesurer les échanges respiratoires (tapis d'activité en calorimètre). Le composé X sera administré par voie orale pendant 31 jours et les tests de performance et d'endurance seront répétés à trois reprises au cours du traitement (en début, au milieu et à la fin du traitement). Les résultats seront comparés à ceux obtenus chez des animaux contrôles recevant uniquement le véhicule. Des prélèvements sanguins seront pratiqués juste après les tests de performance et d'endurance et un prélèvement d'organes et de sang sera pratiqué à l'issue de l'étude. Au total, ce protocole nécessitera l'utilisation de 40 animaux divisés en 4 groupes de 10 animaux :
- deux groupes traités avec le composé X, l'un nourri avant les tests physiques, l'autre mis à jeun pendant 12h.
- deux groupes « contrôle » traités au véhicule, l'un nourris avant les tests physiques, l'autre mis à jeun pendant 12h.

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

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un traitement sur le métabolisme énergétique au cours d'une activité physique.

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

- Raffinement : Le modèle animal d'obésité et de diabète qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur ces pathologies et leurs complications. Un enrichissement des cages d'hébergement sera assuré par l'ajout de briquettes de bois. Par ailleurs, les animaux seront suivis de façon quotidienne à l'aide de feuille de score de façon à détecter tout signe d'inconfort et de permettre une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

6559. Le contexte global du projet est la mise au point et la sélection de biomatériaux qui pourront être utilisés chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

Ces biomatériaux, qui sont très spécifiques, doivent être durables. Or la principale cause de dégradation des biomatériaux utilisés en chirurgie cardiaque, par exemple pour le remplacement de valves, est leur calcification.

Il est donc indispensable d'évaluer ce « vieillissement », c'est-à-dire cette calcification.

Le modèle animal utilisé est le jeune rat. Il a en effet été montré une similitude entre le dépôt de calcium sur un biomatériau implanté pendant un mois dans le tissu conjonctif du jeune rat et celui implanté pendant 5 ans chez l'homme. Ainsi donc, on peut mimer le vieillissement de 5 ans de ces biomatériaux grâce à des études durant 1 mois sur des rats.

A ce jour, aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer à l'utilisation de ce modèle animal. Aucune méthode alternative ne permet non plus actuellement de reproduire la calcification du tissu conjonctif. Il est donc indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier ce phénomène.

Seuls des rats seront utilisés dans ce projet et leur nombre par étude a été réduit au minimum tout en évitant de compromettre les résultats du projet : au total, en 5 ans, au maximum 400 rats provenant d'élevages agréés seront utilisés. Ce nombre pourra éventuellement être réduit si les résultats le permettent.

Afin de réaliser les procédures dans le plus grand respect de l'éthique animale, les actes techniques seront réalisés par des personnes formées et compétentes. Les chirurgies nécessaires à l'implantation des biomatériaux seront toujours réalisées sous anesthésie générale et avec des traitements analgésiques adaptés. Les prélèvements des biomatériaux après un mois d'implantation seront réalisés après anesthésie générale et euthanasie. L'hébergement collectif sera systématique et les jeunes rats seront laissés avec leur mère jusqu'au sevrage, conformément aux pratiques standard d'élevage.

6560. Le tissu osseux est un tissu vivant minéralisé très complexe remodelé en permanence, en masse et en architecture, pour s'adapter à la croissance, au vieillissement et aux contraintes mécaniques. Le remodelage osseux est assuré par un mécanisme complexe où interviennent à la fois des mécanismes hormonaux (hormone parathyroïdienne, calcitonine, œstrogènes, etc.), des signaux provenant du microenvironnement osseux (RANKL, TNF- $\alpha$ , etc.) et des facteurs biomécaniques. Une altération de la réponse à ces signaux conduit au développement de maladies osseuses fragilisantes telle que l'ostéoporose en réduisant la résistance mécanique et en entraînant un risque accru de fracture.

Les stratégies thérapeutiques disponibles actuellement dans le traitement des ostéoporoses présentent certaines restrictions d'usage ou ne sont pas efficaces sur l'ensemble des sites fracturaires. De nouvelles solutions thérapeutiques sont clairement requises.

Une régulation du remodelage osseux par le système gastro-intestinal est suspectée. En effet les récepteurs à certaines hormones intestinales sont exprimés par les cellules osseuses et les souris déficientes en certains de ces récepteurs présentent des altérations de la qualité osseuse avec une diminution de la minéralisation et de la réticulation du collagène conduisant à une fragilité osseuse accrue. De même, l'administration d'analogues stables de ces hormones intestinales chez le rongeur non ostéoporotique ou diabétique augmente la minéralisation et la réticulation du collagène.

Les buts de ce projet de recherche sont de valider *in vivo* le design et l'efficacité d'analogues stables des hormones intestinales sur la qualité et la résistance osseuse dans des modèles d'ostéoporose (carence en œstrogènes et corticothérapie prolongée) chez la souris. Les résultats escomptés sont de montrer la supériorité de tels traitements comparés aux thérapies actuelles.

Ce type de projet requiert une étape de validation de ces analogues *in vivo* avant une possible utilisation chez l'homme et nécessite l'utilisation de modèles animaux d'ostéoporoses ne pouvant être remplacés par d'autres tests. Un total de 264 animaux, répartis en 22 lots, est requis pour conduire à bien ce projet. Ce nombre d'animaux a été déterminé après analyse statistique de l'échantillonnage à partir de données obtenues préalablement et constitue le plus petit nombre d'animaux permettant d'aboutir à des résultats significativement exploitables scientifiquement. Une grille de point limite a été mise en place pour réduire les souffrances des animaux survenant pendant le déroulement du projet.

6561. Les cancers de l'enfant représente la deuxième cause de mortalité chez les moins de 15 ans, après les accidents domestiques. Alors que les taux de guérison sont excellents pour plusieurs d'entre eux, le pronostic de certains cancers pédiatriques demeure très sombre et les traitements anti-cancéreux conventionnels peu efficaces. L'étude des altérations génétiques des tumeurs permet d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la maladie dont certains pourraient être utilisés dans le cadre de thérapies



ciblées. Afin de mettre en place de telles thérapies, il est indispensable de disposer de modèles précliniques pertinents permettant d'évaluer *in vivo* de nouvelles molécules. Pour ce faire, nous utilisons deux types de modèles chez la souris : des animaux génétiquement modifiés, présentant des altérations équivalentes à celles présentes dans les tumeurs des enfants, et des souris greffées avec des tumeurs des animaux génétiquement modifiés. Nous utilisons également les modèles murins afin d'étudier les interactions entre différents gènes partenaires et certains aspects plus fondamentaux concernant le fonctionnement des gènes impliqués dans les cancers pédiatriques et pour tester de nouvelles molécules anticancéreuses.

Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaire est de 1024 souris.

En accord avec les réglementations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont stoppées avant la souffrance de l'animal présentant une tumeur.

6562. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des composés probiotiques. Ce composé est destiné à l'amélioration des troubles métaboliques. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact du composé X sur la prise alimentaire et le poids corporel chez des souris saines soumises ou non à un régime hyperlipidique pendant 15 semaines. Les données obtenues devraient permettre à la société cliente de mettre en évidence l'impact de leur composé sur les paramètres d'intérêt. Le composé X sera administré de façon journalière par gavage oral, la durée totale de traitement étant de 15 semaines. Ce traitement par le composé X sera administré chez des souris soumises soit à un régime alimentaire hyperlipidique (HFD, 45% de graisses) soit à un régime standard. Un total de 48 souris C57BL/6j sera utilisé, divisé en 4 groupes de 12 animaux :

- 2 groupes soumis à un régime standard, traités soit avec le composé X soit avec son véhicule
- 2 autres groupes soumis à un régime hyperlipidique, traités soit avec le composé X soit avec son véhicule.

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

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

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

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (3 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification.

Enfin, bien que le protocole soit peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

6563. La recherche de notre équipe est d'analyser les bases cellulaires de l'hyperémie fonctionnelle, c'est à dire le lien entre l'activation cérébrale et l'augmentation réflexe du flux sanguin, lien qui est à la source de l'imagerie fonctionnelle cérébrale de type fIRM chez l'homme.

Notre but est donc de caractériser l'ensemble des types de cellules cérébrales (tels les neurones ou les cellules gliales) participant à la régulation de ce phénomène.

Plus précisément, nous projetons d'étudier, dans le bulbe olfactif du rongeur anesthésié, les réponses calciques cellulaires et vasculaires à la présentation d'odeur ou à la photoactivation. Sur le plan technique, nous observerons ces réponses en utilisant la microscopie bi-photonique, l'imagerie ultrarapide ultrasonore (ultrafast ultrasounds) et l'électrophysiologie. Ces expériences seront effectuées après craniotomie et pose d'une fenêtre d'observation en verre ou en plastique transparent.

Nous vérifierons si les résultats obtenus restent valables au niveau du néocortex.

Notre approche, limitera le nombre d'animaux utilisés dans la mesure où les réponses cérébrales seront enregistrées simultanément avec plusieurs techniques. Il n'existe pas de méthode alternative possible.

Afin d'analyser le rôle de 4 principaux types de cellules du cerveau, 8 modèles de souris transgéniques seront utilisées par an, à raison de 32 souris par modèle et 32 souris contrôles soit 288 souris chaque année. Pour les rats, nous étudierons 1 lignée de rats transgéniques (32 rats) et une lignée contrôle (32 rats Sprague Dawley) chaque année. Pour les 5 ans du projet, le nombre de rongeur s'élève à 1760 (1440 souris et 320 rats).

L'observation de l'activité cérébrale sera menée soit de manière aigüe au cours de la pose de la fenêtre d'observation, soit dans un deuxième temps les animaux seront réanesthésiés plus tard après la pose d'une fenêtre transparente. Dans chaque cas l'expérience est menée sous anesthésie générale. Les animaux seront chaque fois euthanasiés en fin d'expérience.

A long terme ce projet permettra

- 1) de comprendre les mécanismes physiologiques régulant le flux sanguin cérébral,
- 2) de comprendre la nature et les limites des signaux utilisés en imagerie fonctionnelle de type IRM chez l'homme,
- 3) de déterminer les bases physiopathologiques de certaines pathologies telles l'ischémie et la maladie des petits vaisseaux. qui rentrent en jeu dans tous les types de maladies neuro-vasculaire et ainsi améliorer les futurs traitements.

Ces résultats contribueront à mieux comprendre les limites de l'imagerie humaine

6564. L'homocystinurie est une maladie métabolique rare due à un déficit de l'enzyme cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) qui provoque l'accumulation dans l'organisme des acides aminés homocystéines et méthionine issus de la métabolisation des protéines apportées par l'alimentation à des niveaux toxiques. Cette accumulation conduit à une altération de nombreux organes (squelette, yeux, système sanguin et système nerveux central). Il provoque entre autre une atrophie cérébrale et un retard mental. De plus, une augmentation d'homocystéine a aussi été associée à des cas d'autisme et des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer et Parkinson. L'inactivation du gène Cbs chez la souris conduit à une accumulation de graisses dans le foie, entraînant la mort des animaux vers l'âge de 5 semaines. Ces animaux présentent une légère réduction de la taille du cerveau et une accumulation d'homocystéine dans les neurones, plus particulièrement dans les neurones de type glutamatergiques au niveau de l'hippocampe, structure impliquée dans l'apprentissage et la mémoire. Cette localisation de l'homocystéine correspond à l'expression de la Cbs dans le cerveau. Toutefois, on ne sait actuellement pas si l'accumulation d'homocystéine dans ces neurones provient d'une production endogène due au déficit de Cbs dans ces neurones ou si elle résulte d'un apport externe via le système sanguin.

- Remplacement :

Dans ce projet, nous utiliserons un modèle de souris dans lequel le gène de la Cbs a été inactivé dans les neurones glutamatergiques afin d'étudier l'impact de cette invalidation sur le fonctionnement de ces neurones et les capacités de mémoire et d'apprentissage des souris. Cette étude nécessite des analyses comportementales ne pouvant se faire que sur un organisme vivant proche de l'être humain.

- Réduction :

Ces expériences nécessiteront 30 souris au maximum, les analyses statistiques utilisées requérant entre 10 et 15 individus par génotype pour être significatives.

- Raffinement :

Différents tests de comportement peu voire non-invasifs seront réalisés aux âges de 3-4 mois et vers 10-15 mois afin de voir l'effet d'une éventuelle accumulation d'homocystéine sur le vieillissement neuronal. L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur (plaies, hérissure du poil, attitude voûtée, perte de poids) seront euthanasiés car impropres à une étude comportementale. Quinze jours à trois semaines après la fin de la deuxième série de tests (10-15 mois), les animaux seront sacrifiés et feront l'objet d'analyses anatomiques et moléculaires.

6565. Avec la promotion de la pratique sportive régulière comme activité ayant des effets bénéfiques sur la santé par les autorités publiques, le nombre de pratiquants de sports de tout type croît régulièrement. Cette promotion de l'activité sportive a également conduit un grand nombre d'athlètes mais aussi de sportifs amateurs à s'initier aux marathons et à la pratique de sports intenses et prolongés comme les triathlons « Ironman », raid multi-sports ou ultra-trails.

Cependant, quelques études dans la littérature rapportent des effets potentiellement délétères de l'exercice intense et prolongé. Pour l'heure, ces altérations ne sont pas bien caractérisées. Il avait été supposé que ces altérations sont liées au remodelage cardiovasculaire induit par l'entraînement. Néanmoins, il apparaît à la lecture du peu de données disponibles dans la littérature que ces altérations liées à la réalisation d'un effort intense et prolongé sont non liées ou même différentes des caractéristiques du « cœur d'athlète ». En effet, au repos, ces athlètes ne présentent pas d'altérations contractiles. Par contre, au cours de la récupération, ces athlètes développent une dysfonction contractile transitoire. Certains groupes ont même développé l'idée d'une cardiomyopathie induite spécifiquement par l'exercice intense et prolongé. Cette cardiomyopathie associe troubles électriques et troubles de la fonction contractile et de remplissage. Il apparaît donc important au vu de ces éléments de caractériser les effets de la pratique d'un sport intense et prolongé sur le système cardiovasculaire. L'effort demandé lors de ces pratiques sportives est difficile à reproduire en clinique et, seule l'investigation de terrain permettra de caractériser les conséquences sur les fonctions cardiaques de cette pratique sportive. Pour l'heure, aucun suivi ou surveillance/vigilance n'est recommandé pour ce type de pratiquant. L'effet intrinsèque sur le cœur et au niveau des cardiomyocytes reste à caractériser, tout comme la chronologie de ces événements.

En résumé, l'exercice aigue intense et prolongé induit plusieurs changements néfastes au niveau cardiaque. Notre étude explorera ces défauts intrinsèques et leurs potentielles interconnexions. Nous utiliserons différents modèles animaux afin de tester des voies de signalisation qui pourraient être impliquées (voies  $\beta$ -adrénergique et nitrosative). Au total 150 rats seront nécessaires (10 rats par groupe et par type d'expérimentation (10 pour le cœur isolé et 10 pour les analyses des pressions intra-ventriculaire) et 5 rats pour les analyses biochimiques) afin de disposer de l'effectif minimum permettant de mettre en évidence des différences statistiquement significative sur les paramètres étudiés. Au cours de l'expérimentation, les animaux seront hébergés (3 par cages) dans des cages transparentes assurant à la fois un contact visuel et olfactif. Leur environnement sera enrichi (wood wool, et top brique en bois). Enfin, l'utilisation du même animal *in vivo* et *in vitro* permet de réduire le nombre d'animaux utilisés au cours du protocole expérimental.

6566. Les rongeurs sauvages sont réservoirs de différents agents pathogènes qui peuvent entraîner des maladies chez l'homme. L'objectif de ce projet est d'effectuer des prélèvements sanguins sur des rongeurs de la faune sauvage afin d'étudier plusieurs agents pathogènes potentiellement présents dans ces populations. Un de ces agents est le virus Puumala (PUUV) responsable chez l'homme d'une fièvre hémorragique avec atteinte rénale. On constate une recrudescence des cas humains de cette maladie en Allemagne près de la frontière alsacienne. En France, la présence de ce virus est surtout connue et suivie dans le foyer historique des Ardennes, (c'est-à-dire le premier foyer de cas humains mis en évidence et qui reste d'ailleurs le plus important en nombre de cas) mais pas en Alsace. L'étude propose d'estimer la circulation du PUUV en Alsace à partir d'un suivi sur plusieurs années des populations de

campagnol roussâtre (*Myodes glareolus*) réservoir principal du virus PUUV et du mulot à collier (*Apodemus flavicollis*) qui partage son milieu de vie. Les différentes variantes génétiques des virus mis en évidence seront comparées avec ceux déjà identifiées en Allemagne, en Belgique et dans les Ardennes. Les résultats sur les évolutions de la présence du virus dans le temps et dans l'espace en Alsace seront comparés avec la situation observée dans d'autres régions de la zone d'endémie soit principalement le quart Nord-Est de la France et plus précisément les Ardennes/Picardie et la Franche-Comté. D'autre part, ces mêmes populations de rongeurs sont impliquées dans le cycle de deux autres maladies qui peuvent atteindre l'homme : la borréliose de Lyme et l'encéphalite à tique (TBE), maladie grave, encore peu connue en France. Les études montrent des corrélations entre incidence humaine (nombre de nouveaux cas qui survient) et densité en tiques infectées, mais les exceptions sont fréquentes. Les recherches viseront donc à préciser le rôle des rongeurs et des tiques dans l'incidence de ces maladies. Enfin, l'identification en septembre dernier du coronavirus MERS-CoV, responsable d'un syndrome très proche du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) provoquant une insuffisance rénale fatale chez l'Homme, constitue un signal clair d'avertissement quant à la persistance du risque d'émergence de maladies chez l'Homme dû à des coronavirus. Les coronavirus peuvent infecter de nombreux hôtes ; incluant les mammifères et les oiseaux. Ainsi, les prélèvements réalisés sur les rongeurs capturés serviront aussi à une étude de la circulation et de la diversité des coronavirus dans la faune sauvage pour évaluer leur potentiel de passage à l'Homme. Ce projet propose d'effectuer 5 sessions de capture par an au moyen de pièges permettant de garder les rongeurs en vie, les pièges sont disposés de manière à pouvoir capturer tous les rongeurs de la zone d'étude. Chaque animal sera identifié par puce électronique, il ne subira qu'une prise de sang par session de piégeage avant d'être relâché sur son lieu de capture. L'effectif total capturé dépendra des fluctuations des populations de rongeurs, le nombre d'animaux capturés par session varie entre 20 et 400, soit au maximum pour 5 sessions par an pendant 5 ans, entre 500 et 10 000 animaux capturés et prélevés au total. Les méthodes utilisées dans les analyses sérologiques nécessitent très peu de sérum, ce qui permet de réaliser les 4 sérologies (PUUV, Borréliose, TBE et coronavirus) sur chaque micro-prélèvement réalisé et ce qui permet de réduire le nombre de rongeurs utilisés dans le projet.

6567. L'insuffisance cardiaque (IC) constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux. La mortalité survient en raison de la dysfonction ventriculaire et des arythmies conséquentes à la suractivation du système nerveux sympathique et au remodelage cardiaque pathologique. La voie Beta-adrénergique (B-AR) conduit à l'augmentation du messager secondaire : adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui agit à l'intérieur de la cellule pour augmenter la fonction cardiaque. Mais son activation chronique entraîne des perturbations électrophysiologiques (arythmies) et participe à la progression vers l'IC. Les niveaux d'AMPC sont finement régulés par des enzymes qui les dégradent, les phosphodiesterases (PDEs). L'objectif du projet est de tester l'hypothèse selon laquelle une augmentation de l'expression d'une phosphodiesterase de type 4 (PDE4B, une enzyme dégradant spécifiquement l'AMP cyclique) dans le cœur pourrait protéger contre la survenue des arythmies cardiaques secondaire à une IC. Un corollaire de cette hypothèse est que l'augmentation de l'activité des PDEs pourrait être une alternative prometteuse ou un complément aux traitements actuels de l'IC. L'étude étant focalisée sur un modèle de pathologie cardiaque qui nécessite une exploration fonctionnelle *in vivo*, il n'est pas possible d'obtenir *in vitro* un déclenchement d'arythmies ventriculaires ni de simuler *ex vivo* la mise en place de l'IC qui est un processus complexe. L'utilisation d'animaux est alors indispensable pour évaluer cette hypothèse. Des souris normales et transgéniques qui surexpriment la PDE4B sont utilisées afin d'évaluer l'effet cardioprotecteur de l'augmentation de son activité. Le bien-être des souris est respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Une planification statistique minutieuse a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et pour avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. De l'enrichissement sera ajouté dans la cage des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de souris utilisées sera de 90.

6568. Ce protocole vise à enseigner l'anatomopathologie sur des modèles murins à des étudiants de licence professionnelle. En effet, de nombreux professionnels embauchant ces étudiants ont signalé la nécessité d'intégrer des enseignements d'anatomopathologie, absents jusqu'à présent, au sein de ces licences, dans le souci d'une insertion professionnelle plus efficace.

Le protocole expérimental des travaux pratiques est cité ci-dessous :

La greffe de cellules murines B16F0 en sous-cutané chez la souris C57Bl6 est un modèle syngénique qui présente plusieurs avantages pour l'enseignement de l'histologie du cancer :

- c'est un modèle syngénique représentatif des interactions cellules tumorales/stroma puisque les cellules tumorales proviennent de ces souris ;

- les B16 sont des cellules de mélanome greffées en sous-cutané ce qui permettra d'obtenir sur les mêmes coupes histologiques de la peau saine et de la tumeur,

- c'est un modèle tumoral se développant assez rapidement (15 jours) ;

- ces modèles murins ne présentent pas de risques pour les étudiants ;

Pour compléter les observations histologiques, des marqueurs moléculaires seront aussi recherchés au sein des tumeurs.

L'utilisation d'1 souris par binôme (donc pour 40 étudiants 20 animaux/an) répond aux exigences de réduction du nombre d'animaux utilisés : chaque souris recevra une greffe sur chaque flanc.

Signalons aussi qu'aucune méthode alternative n'est connue pour obtenir des interactions cellules tumorales/stroma en histologie à ce jour.

6569. Ces dernières années, une nouvelle classe de traitements des cancers a été développée visant à inhiber la formation des vaisseaux sanguins dans une tumeur, dans le but de créer un manque d'oxygène qui a pour but final d'asphyxier la tumeur et donc conduire à la destruction des cellules tumorales. Les résultats de ces nouvelles molécules en termes d'amélioration de la survie des patients ont été très en deçà des espérances. Il est apparu que, contrairement à ce qui était annoncé, les tumeurs développent assez rapidement différents mécanismes de résistance contre ces agents.

Ceci nous a conduits à étudier le rôle d'une protéine exprimée par de nombreux types cellulaires normaux et tumoraux. Son expression est corrélée avec une augmentation de la dissémination métastatique. De ce fait, nous souhaitons inhiber cette protéine afin d'éviter la formation de métastases, les métastases étant la cause majeure de décès par cancers.

Dans un premier temps, nous souhaiter regarder si notre molécule permet d'inhiber la protéine responsable de l'augmentation des métastases. Pour cela, il est nécessaire pour mieux connaître l'action de notre molécule de l'administrer chez des souris. Il *in vitro* a eu une étude en amont sur des cultures cellulaires mais celles-ci ne permettent pas de mimer ce qu'il se passe réellement dans un organisme entier.

Le nombre de souris Balb/c totales nécessaires à cette étude est de 80 souris au total à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), donc 8 groupes au total.

Cette procédure pourra être réalisée 3 fois sur 5 ans soit un nombre total d'animaux de 240 souris

Lors de cette procédure nous veillerons à ce que le bien-être des animaux soit une priorité. Tout d'abord, la démarche de traiter via une administration continue sous-cutanée permettra de s'affranchir d'une injection quotidienne chez les animaux. Nous utiliserons un analgésique lors de l'implantation des pompes pour éviter toute douleur à l'animal.

Ensuite, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement de type Nestlet (carré de coton) sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire leur nidification.

Enfin, durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours *in vivo*, y compris le week-end où le personnel de la zootechnie viendra s'assurer du bien-être des animaux. Dans le cas où des signes cliniques pouvant indiquer une souffrance de l'animal seraient observés (Critères observés : état du pelage de l'animal, comportement, perte d'appétit, amaigrissement, déshydratation, fréquence respiratoire anormale, dilatation des pupilles et ouverture de l'œil anormales, irritation/brûlure/nécrose cutanée au point d'administration du produit), la procédure sera immédiatement stoppée.

Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

6570. Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. Le but à long terme de cette recherche est d'offrir un traitement anticancéreux plus efficace avec moins d'effets secondaires en testant un nouvel agent chimique capable d'augmenter l'efficacité des drogues anticancéreuses existantes dans la pratique clinique actuelle. Il est donc d'un intérêt majeur de tester le potentiel thérapeutique de cette molécule dans le cancer du sein. Un pas vers ce but implique une expérimentation chez l'animal. En effet, selon les connaissances actuelles il n'est pas possible de REMPLACER le modèle animal, car la tumeur se développe au sein d'un hôte et le dialogue entre l'hôte et le cancer ne peut pas être créé au laboratoire *in vitro*. Dans ce projet, nous utiliserons un modèle génétique de cancer du sein chez la souris, modèle représentant bien le déroulement de la maladie chez l'Homme.

**REDUCTION** : Ce modèle permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser car ces souris développent des tumeurs de la glande mammaire selon une séquence connue ainsi seules des souris malades seront expérimentées. De plus ce modèle a été utilisé par de nombreux scientifiques et les documents disponibles permettent à la fois de réduire les cohortes et de raffiner la méthodologie. Ainsi, pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement interprétables, nous utiliserons des groupes de 10 animaux (et 5 pour le groupe contrôle), montant le total à une cohorte de 45 animaux pour tout le projet. De plus, le maintien de cette lignée nécessitera l'utilisation de 24 mâles porteurs de la mutation, portant ainsi le total d'animaux utilisés à 69.

**RAFFINEMENT** : les animaux présentant un cancer seront suivis de façon très rapprochée afin d'éviter toute souffrance. Le développement potentiel de métastases sera également suivi. Ainsi des points limites seront établis afin d'arrêter l'expérimentation au plus tôt. Enfin, afin d'éviter tout stress, les procédures contraignantes seront réalisées sous anesthésie générale.

6571. L'objectif de ce projet de recherche est de tester les potentialités d'applications de nouvelles nanoparticules minérales luminescentes dans le domaine de la recherche biomédicale.

Ce programme de recherche se propose, notamment, 1) d'évaluer l'utilisation des nanoparticules comme marqueur intracellulaire pour des études *in vitro*, 2) de développer un système de marquage permettant le suivi de cellules greffées dans un organisme entier. En accord avec la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale, cette étude a été construite autour de la règle des 3R : Les approches concernant les conditions expérimentales d'internalisation des nanoparticules dans des cellules (*in vitro*) ont été validées (remplacer) et nous arrivons à l'étape de validation du marquage au niveau *in vivo*. En effet, aucun système *in vitro* ou *in silico* ne permet de reproduire la distribution dans un organisme. L'expérience sera organisée de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Notre étude nécessitera la comparaison de 7 groupes expérimentaux chez le rat et nous prévoyons d'inclure au maximum 5 animaux par groupe pour chaque génération de nanoparticules donc (7 groupes x 5 rats x 2 lots =) 70 animaux et 40 animaux (4 groupes x 5 animaux x 2 lots) pour la souris. Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute souffrances ou dommages que pourraient ressentir les animaux, ce qui mènerait à une adaptation/modification du protocole (raffiner).

La greffe de cellules préalablement marquées dans un cadre de thérapie cellulaire est une approche qui est pratiquée couramment dans l'équipe de recherche et qui a donné lieu à plusieurs publications. De plus, l'administration systémique de nanoparticules différant simplement par la nature de l'agent dopant de celles utilisées dans cette étude, a déjà été étudiée chez la souris par un laboratoire partenaire (Etude par IRM sur 15 jours).

L'intérêt de ce projet est de concevoir un nouveau procédé de marquage cellulaire autorisant le suivi des cellules greffées par l'intermédiaire de différentes techniques multimodales (fluorescence, IRM, Rayons X...) tout en étant le moins invasif possible. Les animaux seront hébergés selon les conditions en vigueur au sein des animaleries et permettant d'assurer un maximum de confort possible (nombre d'animaux / cage). De plus, un enrichissement de leur environnement sera réalisé (carrés de ouate, rouleau de carton) de façon à créer un environnement le moins anxiogène possible. Les animaux seront surveillés quotidiennement par un zootechnicien informé du protocole et l'ensemble des personnes amenées à participer à ce protocole présenteront une formation spécifique.

6572. Les cardiopathies ischémiques constituent la plus forte cause de morbidité et de mortalité dans le monde. Outre une mortalité accrue à court terme, elles évoluent inéluctablement vers l'insuffisance cardiaque (IC) et ce malgré les grands progrès thérapeutiques de ces dernières décennies (médicaments, angioplastie...). De nombreux essais ont tenté de restaurer la fonction cardiaque ou de prévenir l'évolution vers l'IC en utilisant des stratégies de thérapie cellulaire visant à remplacer les cellules contractiles du cœur (les cardiomyocytes) détruites par le processus ischémique. Malgré des résultats encourageants chez l'animal, il n'y a pas à ce jour de preuve de leur efficacité chez l'Homme.

De plus les stratégies classiques de thérapie cardiaques posent de nombreux problèmes éthiques (origine des cellules) et techniques (préparation des cellules, injection dans le tissu cardiaque, mesure de la survie de la greffe...). C'est pourquoi depuis quelques années, la recherche s'est tournée vers les cardiomyocytes résidents du tissu cardiaque. Il a été montré que contrairement au dogme établi, ces cellules sont capables de proliférer spontanément mais surtout en réponse à un stress pharmacologique (apport de facteur de croissance).

Dans ce contexte, notre équipe a identifié une protéine, éphrine-B1, naturellement exprimée par le cardiomyocyte et qui est cruciale pour le maintien de la cohésion du tissu mais qui a également la capacité d'inhiber la prolifération des cardiomyocytes. Ainsi chez des animaux transgéniques invalidés pour cette protéine spécifiquement au niveau cardiaque, il existe une prolifération spontanée des cardiomyocytes. De plus nous avons montré que chez ces animaux invalidés pour éphrine-B1, la résection de la pointe du cœur est suivie d'une régénération totale du tissu. Néanmoins ce modèle reste très éloigné de la physiopathologie humaine et nous souhaitons donc vérifier que l'absence d'éphrine-B1 s'accompagne d'une augmentation des capacités prolifératives des cellules contractiles cardiaques soumises à stress d'intensité modéré. Dans ce but nous souhaitons utiliser chez la souris un modèle de perfusion continue d'angiotensine 2 à l'aide de mini-pompes osmotiques implantables et à doses faibles et non hypertensives. Il s'agit d'un modèle bien décrit dans la littérature dont les effets sur le cœur sont bien connus mais pas ceux sur la prolifération des cardiomyocytes.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

- Il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs pour l'étude du potentiel de régénération cardiaque par la prolifération des cardiomyocytes résidents.
- L'expérience a été organisée de manière afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. 40 souris seront nécessaires pour la totalité de l'expérimentation.
- L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et des potentiels effets indésirables des procédures sur leur état de santé global.

6573. Le projet a pour objectif d'évaluer la bio distribution cérébrale et corps entier d'un bio marqueur TEP (Tomographie Emission de Positron) fluoré ciblant les récepteurs NMDA activés. Ces récepteurs jouent un rôle dans l'apprentissage, la mémoire, la plasticité neuronale, la neurogénèse. Ils sont aussi impliqués dans les phénomènes d'excitotoxicité entraînant un afflux de glutamate provoquant des signaux d'apoptose pour la cellule. Ce phénomène pourrait potentialiser la neurodégénérescence liée à la maladie d'Alzheimer et à d'autres démences et être en cause dans phénomènes de potentialisation toxique après une commotion cérébrale ou un stress post traumatique.

La première étape du projet consiste en une analyse fine de la biodistribution cérébrale d'un biomarqueur fluoré ciblant ce récepteur grâce à de l'autoradiographie. Cette étape va nous permettre de vérifier la spécificité du produit *in vivo* et de confirmer le passage de la barrière hémato-encéphalique. La distribution cérébrale du biomarqueur sera alors comparée à celle obtenue *in vitro*.

Cette première partie utilise 3 animaux est une étape de sélection du biomarqueur : nous allons obtenir des informations sur sa capacité de fixation spécifique (récepteur NMDA). Si nous jugeons que cette étape est non concluante, les autres procédures ne seront pas mises en place. Nous agirons alors sur la molécule afin de créer des variantes possédant des propriétés plus intéressantes. Il s'agit de déterminer quel biomarqueur peut nous donner le profil recherché.

La deuxième étape consiste en une analyse de la bio distribution et une quantification de la captation du radio traceur grâce à une caméra microTEP.

Les rats permettront d'évaluer la biodistribution corps entier et d'étudier la bio distribution cérébrale du traceur. Il sera réalisé des images dynamiques qui permettront d'évaluer les phases d'Administration, Distribution, Métabolisation et Elimination du biomarqueur.

La troisième étape consiste à montrer que le biomarqueur est capable de discriminer une zone d'hyperactivation des récepteurs NMDA. Pour cela un activateur des récepteurs NMDA, sera injecté au niveau d'un hémisphère cérébral à 5 animaux anesthésiés, Cette activation sera étudiée par imagerie microTEP après injection du radiotraceur. Une autoradiographie *ex vivo* sera pratiquée sur ces animaux. Cette expérimentation nous permettra d'évaluer la capacité du radio traceur à discriminer une hyper activation des récepteurs NMDA par comparaison de l'hémisphère sain et de l'hémisphère traité.

Il sera nécessaire d'utiliser 35 rats pour valider les 3 étapes.

Aucun système *in vitro* ne peut mimer le système complexe que représente le cerveau (passage de la barrière hémato encéphalique, diffusion et liaison à un récepteur), l'utilisation de l'animal est incontournable.

Nous appliquons la règle des 3Rs :

- Remplacement : nous avons au préalable réalisé des expériences de binding *in vitro* afin de sélectionner la molécule la plus prometteuse et de tester *in vivo* le moins de variants possible.
- Réduction : L'imagerie permet d'avoir un profil de captation sur toute la durée de l'examen et permet de s'affranchir d'un sacrifice à des temps différents pour évaluer la captation par organe.
- Raffinement : les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie et prise d'antidouleurs.

#### 6574. Présentation de la société et des produits

La SOCIETE développe, fabrique et commercialise des hydrolysats protéiques dits fonctionnels. Par fonctionnels, nous entendons qu'en plus de leurs attributs nutritionnels et appétants, ces hydrolysats protéiques peuvent aussi posséder des propriétés bioactives, c'est-à-dire impactant l'état physiologique et/ou de santé des organismes testés. Deux procédés d'hydrolyse différents appliqués sur une même matière première résulteront généralement en 2 profils peptidiques distincts dont résulteront différentes propriétés bioactives.

Certaines de ces propriétés bioactives ont été démontrées chez l'ensemble des vertébrés, de la souris à l'homme, ainsi que chez les poissons. La SOCIETE a d'ailleurs contribué significativement à ces démonstrations chez les poissons (*Pagrus major* et *Paralichthys olivaceus*) en collaboration avec une Université asiatique ; ces résultats ont été publiés dans plusieurs revues à comités de lecture.

Les hydrolysats fonctionnels sont généralement inclus à hauteur de 5% (+/- 3%) dans un aliment nutritionnellement équilibré, et suffisamment appétant, pour assurer une croissance optimale de l'organisme étudié.

Présentation de l'étude et des tests d'effort

Les poissons carnivores utilisent les acides aminés d'origine alimentaire comme source d'énergie, justifiant ainsi un apport protéique important dans les rations alimentaires. Les hydrolysats protéiques contiennent des acides aminés libres, di et tripeptides grande quantité. Ces derniers ont la capacité d'être absorbés très rapidement grâce à leur digestibilité presque parfaite. Cette biodisponibilité élevée associée à des activités biologiques antioxydantes, immunostimulantes, ... pourraient permettre aux poissons d'acquiescer une résistance élevée aux challenges environnementaux susceptibles d'être rencontrés en conditions d'élevage (faible oxygène, forte température et vitesses de courant élevées). C'est l'hypothèse qui va tenter d'être confirmée par les expériences décrites ci-dessous. Les bénéfices physiologiques des hydrolysats chez les poissons sont obligatoirement conditionnés par leur assimilation préalable, c'est pourquoi une étape de conditionnement alimentaire est nécessaire. D'après notre expérience, ce conditionnement alimentaire, pendant lequel nous récupérerons des indicateurs de performances zootechniques (SGR, FCR, survie), doit être au minimum de 4 semaines et, et peut s'étendre à 12 semaines en fonction de la taille des poissons et de l'objectif zootechnique ciblé. La procédure d'élevage ne sera pas détaillée car celle-ci est conforme aux pratiques communes de l'industrie avec des densités d'élevage très faible (<10kg de biomasse par m<sup>3</sup> d'eau), des aliments équilibrés répondant à l'ensemble des besoins nutritionnels et un taux de renouvellement de l'eau (250%/heure) assurant une qualité d'eau toujours optimale.

A l'issue de cette étape de conditionnement alimentaire, il est proposé de réaliser des tests d'effort séquentiels, c'est-à-dire les uns à la suite des autres, ou uniques. Ces tests d'effort, non invasifs pour les organismes étudiés, permettront de vérifier in-situ les propriétés bioactives des aliments expérimentaux, et donc des hydrolysats. 3 tests d'effort sont ici proposés : un test en tunnel de nage, un test en condition d'hypoxie et un test en condition d'hyperthermie. Les procédures de chacun de ces tests seront détaillées plus loin ; aucun de ces tests n'a vocation à impacter de manière irréversible les organismes étudiés. Il n'est ainsi pas question d'atteindre le point limite des organismes étudiés.

A l'issue de ces tests d'effort, un effectif réduit est retenu pour des prises d'échantillons biologiques qui permettront d'étudier les mécanismes d'actions métaboliques et vérifier in-vivo les propriétés bioactives des aliments expérimentaux, et donc des hydrolysats. Ces prélèvements seront réalisés après euthanasie des individus retenus, en conformité avec les exigences de raffinement de la règle des 3R (euthanasie par sédation profonde si pas d'impact sur les paramètres étudiés ; percussion de la boîte crânienne dans le cas contraire).

La vocation finale de cette étude est le développement d'ingrédients fonctionnels pour le marché de l'alimentation aquacole, permettant d'augmenter la productivité des élevages piscicoles et le bien-être des poissons. Les résultats de cette étude ont également vocation à être publiés dans des revues techniques ou journaux scientifiques.

En bref,

L'étude se déroule en 3 étapes :

- Conditionnement alimentaire avec 2 à 8% d'hydrolysats fonctionnels dans des aliments expérimentaux permettant une croissance optimale des organismes étudiés
- Tests d'effort démontrant les fonctionnalités des aliments in-situ et permettant de réduire le nombre de prélèvements biologiques
- Prélèvements de tissus biologiques dans le but de caractériser la performance des hydrolysats protéiques (contrôles immunologiques et physiologiques)

Le principe des 3R est respecté de la manière suivante :

- Remplacement et réduction : des tests d'effort non invasifs sont privilégiés aux prises de tissus biologiques. Alors que 960 poissons sont concernés par la phase de conditionnement alimentaire pour chaque étude, seuls 240 poissons réaliseront un ou des test(s) d'effort(s) non invasifs et moins de 72 poissons seront mis à mort pour prélèvements de tissus biologiques. Il est programmé un

maximum de 6 études par an, pendant 5 ans. Le nombre maximum de poissons concernés par les tests d'effort et les prises de tissus, après sacrifice, sera donc de 7200 (240 x 6 x 5) et 2160 (72 x 6 x 5) respectivement.

- Raffinement : le stress et la douleur des individus sont limités à leur minimum par :

1. L'arrêt des tests d'effort dès la perte d'équilibre
2. La mise à mort réglementaire des poissons avant prélèvement de tissus biologiques.

Le projet se déroulant sur 5 ans, il sera identifié par "FitFish 1" pour la première année, "FitFish 2" pour la seconde et ainsi de suite.

6575. Nous nous intéressons au fonctionnement normal de la peau humaine et à ses dérèglements dans des maladies fréquentes comme l'eczéma (20% des enfants et 3% des adultes dans les pays industrialisés) ou beaucoup plus rares comme certaines maladies dermatologiques d'origine génétique, exemple le "peeling skin disease" (moins d'une dizaine de familles génétiquement caractérisées) ou les ichtyoses autosomiques récessives congénitales (prévalence = 7 pour 1 million). Pour cela, nous avons mis au point des systèmes d'étude basés sur la reconstruction tissulaire en 3 dimensions à l'aide de cellules de peau humaine isolées, cultivées et modifiées *in vitro*. Cependant, ces systèmes ne permettent pas de répondre à toutes les questions posées et en particulier ne peuvent pas reproduire la complexité de l'organisme dans son entier. Par exemple, il est difficile de reproduire toutes les étapes de la cicatrisation. L'utilisation de modèles de souris est donc nécessaire pour compléter et valider les résultats obtenus. Les expériences qui ne peuvent être réalisées *in vitro* ont cependant été conçues de façon à n'utiliser qu'un nombre limité de souris. D'autre part, toutes les précautions sont prises pour leur éviter les sensations de douleur ou d'angoisse.

Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser (546 animaux pour la totalité des études) contribueront à répondre à des questions fondamentales et surtout à mieux comprendre les mécanismes à l'origine des maladies de la peau, une étape indispensable au développement de futures stratégies thérapeutiques. En effet, la physiologie de la peau humaine et celle de la souris sont similaires.

6576. Les femmes développent des réponses immunes plus importantes que les hommes, expliquant que les hommes souffrent davantage de pathologies infectieuses et qu'elles soient plus sévères que chez les femmes. Par contre, les femmes sont plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes et des maladies allergiques. Paradoxalement, la grossesse peut améliorer des maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques (SEP) pour laquelle il existe un modèle chez la souris, l'encephalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Il est important de comprendre ces effets paradoxaux.

Pour comprendre comment la grossesse améliore la SEP, la souris représente un modèle de choix car l'administration de fortes doses d'œstrogènes inhibe le développement de l'EAE et que nous disposons de souris invalidées pour le récepteur aux œstrogènes alpha (REa) dans différents types de cellules immunes et pour différents éléments de signalisation. L'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les œstrogènes inhibent l'EAE a comme but final de désigner des cibles thérapeutiques ou des analogues des œstrogènes permettant d'améliorer la SEP.

Vu les effets complexes des œstrogènes et les enjeux thérapeutiques visant à diminuer ou amplifier la réponse immunitaire selon le contexte, il est nécessaire d'utiliser des modèles *in vivo*. Les protocoles d'immunisation chez la souris peuvent engendrer des douleurs. Nos protocoles ont été mis au point pour diminuer au maximum les effets indésirables liés à l'immunisation. Des points-limites sont prédéfinis afin de limiter l'altération des conditions de vie. Nous tentons aussi de maximiser les paramètres étudiés pour limiter le nombre d'animaux. Le nombre maximum de souris sera de 360 souris.

6577. Le projet se place dans un contexte clinique de traitement des glioblastomes (= tumeurs cérébrales les plus graves) récidivants et non opérables. La finalité de ce projet est donc de proposer une solution thérapeutique alternative par thérapie photodynamique interstitielle (iPDT) (fibre optique insérée au sein de la zone tumorale) adaptée au traitement de ces tumeurs : dans ce contexte, il s'agit d'une modalité nouvelle de prise en charge.

En nous appuyant sur de nombreux résultats *in vitro* encourageants, nous devons désormais valider *in vivo* chez l'animal la faisabilité du concept qui consiste à réaliser la thérapie photodynamique interstitielle guidée par IRM. Cette étude préclinique doit permettre d'évaluer le bénéfice en termes de survie et de réponse au traitement du glioblastome chez le rat.

La stratégie est double : d'une part, traiter la tumeur cancéreuse par un traitement local et ciblé qui utilise la lumière apportée par une fibre optique et, de l'autre, asphyxier le tissu tumoral en s'attaquant au réseau vasculaire qui l'alimente. Des nanoparticules multifonctionnelles sont optimisées pour permettre à la fois l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et le traitement iPDT.

Après les évaluations d'efficacité *in vitro*, ce concept thérapeutique nécessite d'être optimisé et validé *in vivo*. Dans ce cadre, l'étude préclinique sera réalisée sur des rats porteurs d'une tumeur intracérébrale. Le Remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible dans le domaine de l'oncologie. Cette étude préclinique nécessitera un maximum de 160 animaux. Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés en appliquant une méthodologie par plans d'expériences (Réduction). Enfin, en conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les rats seront anesthésiés dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie), et mis à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement) : notamment, un test d'éviction d'obstacles permet un suivi d'éventuels traumatismes causés par l'opération, et d'évaluer le comportement de l'animal.

De plus, nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive (IRM) permettant de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement) et de pouvoir réaliser différents types d'examen, et de les réitérer dans le temps sur un même animal (Réduction). Les animaux seront mis à mort en fin d'expérimentation par injection létale d'anesthésique.

6578. L'objectif de ce projet est de fournir aux acteurs de la recherche préclinique un outil d'investigation des fonctions cardiaque et respiratoire totalement non-invasif utilisable chez le petit animal. Ce dispositif permettra à terme d'enregistrer ces variables chez un animal totalement libre de ses mouvements et avec la seule contrainte de la présence d'un vêtement.

A ce jour nous avons achevé la phase de développement technologique d'un prototype complet incluant l'essentiel des algorithmes de traitement et démontré sa validité sur un banc métrologique (banc d'essai « sur table » totalement mécanisé). Nous avons, de plus, déposé un brevet en 2015 pour protéger l'invention.

Le passage à l'expérimentation chez l'animal est aujourd'hui nécessaire pour deux raisons majeures :

- La mise au point du système d'étalonnage des grandeurs mesurées sur animal vivant (afin d'obtenir un matériel permettant une mesure étalonnée en unité internationale) ;
- La validation de l'instrument par rapport aux « gold-standards » utilisés aujourd'hui pour monitorer le débit cardiaque et le débit respiratoire.

La mise au point de ce dispositif d'évaluation cardio-respiratoire innovant s'inscrit parfaitement dans l'application et la généralisation de la règle des 3R.

En effet, le caractère non-invasif de notre dispositif permettra le Remplacement de méthodes invasives nécessitant le plus souvent l'euthanasie de l'animal à court terme par une technologie non invasive et totalement indolore. La Réduction du nombre d'animaux (mesure simultanée des fonctions cardiaque et respiratoire sur les mêmes animaux et de façon répétée dans le temps et sur le même animal) et le Raffinement des expériences (l'absence totale de douleur lors de la mise en place du dispositif et de l'acquisition des données permettra une préservation du phénotype de l'animal tout en conservant une qualité de mesure au moins comparable à celle des dispositifs invasifs existants

Le nombre d'animaux utilisés (40 rats Wistar) a été réduit au maximum afin de garantir des résultats interprétables sur le plan statistique. A l'issue de la procédure chirurgicale réalisée sous anesthésie générale les animaux seront euthanasiés.

6579. Notre projet concerne la description des changements de l'organisation fonctionnelle des réseaux cortico-striataux dans des modèles murins de maladies neuropsychiatriques (dépression, schizophrénie, retard mental et autisme) et l'élucidation des mécanismes cellulaires de plasticité sous-jacents à cette réorganisation. La compréhension de ces mécanismes implique l'utilisation de modèles murins mutants et environnementaux.

Notre stratégie expérimentale consiste en l'association d'expériences comportementales et de méthodes ex-vivo d'électrophysiologie / biochimie et anatomie.

Une partie de nos expériences impose l'utilisation de souris modèles du retard mental, de l'autisme et de la schizophrénie : souris *fmr1y/-*, *CYFIP-/-*, *intégrine bêta 1-/-* et *reeler +/-*. Une autre partie des expériences implique des modèles environnementaux : déséquilibre alimentaire en acides gras polyinsaturés oméga3/oméga6, exposition à un cannabi-mimétique durant l'adolescence ou la gestation et exposition à des lipopolysaccharides bactériens à différents stades postnataux

Globalement, les résultats de notre étude nous permettront d'identifier des réseaux neuronaux perturbés dans des modèles pathologiques, d'identifier les mécanismes cellulaires sous-jacents et de proposer de nouvelles voies et cibles thérapeutiques.

Ce projet utilisera des souris C57Bl6, et des rats Wistar car ceux-ci présentent une organisation des réseaux cortico-striataux proches de ceux décrits chez l'homme. Un total de 2548 animaux seront utilisés. Les modèles souris génétiquement modifiés qui modélisent de manière fidèle les pathologies neuropsychiatriques sont couramment utilisés en neuroscience rendant nos résultats pertinents pour une large communauté scientifique. Les rats sont choisis dans une procédure du fait de la richesse de leur répertoire comportemental et afin de rester en cohérence avec des résultats déjà publiés et diminuer le nombre d'animaux utilisés. L'organisation des réseaux cortico-striataux change en fonction du stade développemental, de l'activité d'autres régions sous-corticales, de l'expérience de chaque individu et de l'influence de l'environnement. De fait, les modèles rats souris ne peuvent pas être (R) remplacés par des modèles de cultures cellulaires *in vitro*.

Réduction (R) et Raffinement (R): Ce projet est conçu pour réduire le nombre d'animaux utilisés en mutualisant au maximum les groupes contrôles et établir des mises aux points communes aux différentes tâches permettant de raffiner les conditions expérimentales. De même nos expériences sont conçues pour que les mêmes animaux soient utilisés dans un maximum de tâches comportementales compatibles et en in-vitro. Chaque souris ou rat servent à plusieurs mesures comportementales et/ou électrophysiologiques et/ou biochimiques et/ou anatomiques. Douleur : Les animaux sont anesthésiés par Xylazine/Ketamine pour toutes les procédures chirurgicales. Ils reçoivent également des analgésiques locaux si nécessaire.

Souffrance et angoisse : Les manipulations par l'expérimentateur sont limitées afin de diminuer le stress. Les animaux sont anesthésiés lorsqu'une manipulation est stressante. Le bien-être des animaux est évalué quotidiennement : prise du poids et observation de leur aspect et comportement.

Tous les animaux bénéficient d'enrichissement pour diminuer l'ennui, l'anxiété et favoriser le bien être (souris: Nid végétal; Tunnels en carton, Balles teintées. Rats : Bûchettes en peuplier; Litière absorbante enrichie; Tunnels en carton).

6580. La capacité à prendre une décision adaptée dans un environnement en perpétuel changement est capitale pour la survie des organismes. Cette capacité repose sur de multiples processus élémentaires qui sont largement conservés entre les espèces. Pour cette raison, l'utilisation de rongeurs permet effectivement de disséquer chez l'animal des fonctions cognitives de haut niveau, fortement intégratives, qui, par définition, ne peuvent s'étudier qu'à l'échelle de l'organisme entier. L'utilisation de rongeurs permet donc de procéder à des études fonctionnelles permettant ainsi de clarifier les bases neurobiologiques de la prise de décision, ce qui est un



enjeu important non seulement en termes de recherche fondamentale, à la croisée entre des disciplines aussi variées que la neurobiologie, la psychologie expérimentale ou encore plus récemment la neuroéconomie, mais également en termes de recherche appliquée, la prise de décision étant inadaptée dans nombre de pathologies mentales comme la schizophrénie ou l'addiction. En lien direct avec cette dernière observation, les relations fonctionnelles entre le thalamus et le cortex préfrontal sont apparues récemment comme un élément central des mécanismes de la prise de décision. Le présent projet, financé par l'ANR, vise par conséquent à clarifier les bases fonctionnelles de l'architecture thalamocorticale chez le Rat. Pour ce faire, nous procéderons à des manipulations fines, réversibles et peu invasives de certains neurones thalamiques et corticaux sélectionnés selon leurs projections spécifiques et nous déterminerons l'impact fonctionnel de ces manipulations dans des épreuves comportementales modélisant certains aspects spécifiques de la prise de la décision mais qui permettent toutes à l'animal d'obtenir des récompenses alimentaire. Les étapes principales de réalisation de ce projet nécessitent donc la description fine de multiples voies anatomiques entre le cortex préfrontal et le thalamus, d'éprouver la fonction des différentes voies observées à deux temps principaux des épreuves comportementales (acquisition initiale et mise à jour des informations) et de contrôler l'efficacité de ces dernières manipulations. 480 rats seront nécessaires pour mener à bien ces expériences. Pour respecter la règle des 3R, les effectifs sont maîtrisés de par notre choix d'opter pour une stratégie d'inactivation neuronale réversible peu invasive permettant ainsi d'utiliser les mêmes animaux (nombre total plus restreint donc) dans plusieurs épreuves comportementales dans lesquelles les animaux ont la possibilité de gagner des récompenses alimentaires, participant ainsi de par les stimulations cognitives qui en résultent à l'enrichissement du milieu pour ces animaux.

6581. Les Poly (ADP-ribose) polymérase (PARPs, une famille de 17 membres) sont des protéines impliquées dans la maintenance de l'intégrité du génome. PARP1 et PARP2 sont maintenant connus comme des acteurs clés de la réponse cellulaire aux dommages dans l'ADN. Leur inhibition présente un intérêt en thérapie du cancer en potentialisant l'action cytotoxique des agents anti-tumoraux. Les inhibiteurs actuellement en essai clinique sont toutefois peu spécifiques et l'un des objectifs en recherche est de décortiquer les propriétés fonctionnelles des autres membres de cette famille et d'évaluer leur contribution dans la réponse cellulaire aux dommages. Dans cette idée, nous avons récemment entrepris la caractérisation biochimique et fonctionnelle de PARP9 jusque-là peu caractérisée. Les données de la littérature suggèrent toutefois que PARP9 est sur-exprimée dans certains lymphomes B agressifs, qu'elle intervient dans la voie de signalisation à l'interféron gamma et qu'elle pourrait participer activement à la réparation des cassures double-brins de l'ADN. Nos données préliminaires non seulement confirment ces hypothèses, mais révèlent en outre que la sur-expression de PARP9 est également observée dans d'autres cancers, comme les cancers coliques. Le projet soumis vise à déterminer et comprendre l'impact de l'absence de PARP9 dans (1) la réponse cellulaire aux agents génotoxiques générant des cassures simple et double brin de l'ADN (irradiation X); (2) la réparation des cassures double-brin physiologiques, observées lors de la commutation de classe opérant lors de la réponse immunitaire; (3) la tumorigénèse spontanée ou radioinduite.

Nous utiliserons 540 animaux pour la réalisation du projet. Avec ce projet nous espérons définir PARP9 comme un nouveau marqueur ou une nouvelle cible en thérapie du cancer.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Nos modèles de lignées cellulaires dans lesquelles nous déplétons PARP9 se heurtent à une transposition dans des modèles intégrés pour l'étude de la tumorigénèse. Les observations actuelles du laboratoire dans ces modèles *in vitro* permettent de proposer PARP9 comme un acteur de la réponse aux dommages à l'ADN mais aussi de la tumorigénèse et la progression tumorale. Toutefois, la validation de ces résultats nécessite des approches *in vivo* chez la souris.

L'exploration des propriétés physiologiques et fonctionnelles de PARP9 nécessite la génération de souris dépourvues de PARP9. Le modèle de la souris PARP9<sup>-/-</sup> que nous avons généré au laboratoire permet de générer des lignées cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris totalement dépourvus de PARP9. Ce modèle cellulaire établi à partir du modèle animal permettra de décortiquer les propriétés biologiques de PARP9 dans la réponse cellulaire aux cassures double-brins et à plus long terme dans d'autres voies cellulaires.

Réduire

Le nombre minimum d'animaux nécessaire aux approches *in vivo* et à l'établissement des fibroblastes embryonnaires de souris a été précisément réfléchi.

La mise en culture de fibroblastes embryonnaires de souris (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) réalisée à partir d'embryons de 13,5 jrs issus de croisements hétérozygotes nécessite une douzaine de femelles gestantes pour obtenir les génotypes souhaités. Les cultures primaires peuvent être immortalisées.

Raffiner (critères d'interruption)

Les injections intra-péritonéales IP des anesthésiants sont effectuées sur animaux vigiles. Dans les études de croissance tumorale, les souris seront étroitement surveillées et pesées. Une euthanasie compassionnelle sera effectuée si les signes suivants sont observés : perte de poids supérieure à 20% au cours du protocole, signes manifestes de douleur (animal prostré, ne se toilettant plus, ne se nourrissant plus, déshydraté ou tumeurs nécrosées).

Pour la mise en culture des fibroblastes embryonnaires, les embryons sont sacrifiés par décapitation.

6582. Le laboratoire, qui est un centre national de référence et centre collaborateur OMS présente une thématique importante de recherche sur les maladies infectieuses en particulier les Mycobactéries. L'ulcère de Buruli est une maladie chronique de la peau qui peut entraîner des incapacités permanentes des membres. La bactérie responsable est une mycobactérie (*Mycobacterium ulcerans*) qui a été signalée dans les régions tropicales et subtropicales du continent africain, sud-américain, en Asie, Australie et au Japon. La moitié des cas signalés dans le monde sont en Côte d'Ivoire. La majorité des lésions se retrouvent sur les membres inférieurs et

affectent particulièrement les sujets jeunes qui séjournent près de zones humides. Les études épidémiologiques n'ont pas démontré une susceptibilité en fonction du sexe.

Le mode de transmission de cette bactérie n'est pas connu exactement. Des lésions traumatiques (coupures, plaies ouvertes) pourraient s'infecter lors d'un contact direct, plus ou moins prolongé avec de l'eau contaminée par *M. ulcerans* et expliqueraient l'augmentation du nombre de cas parmi les patients pratiquant la riziculture. La bactérie pourrait être introduite dans les tissus sous cutanés à l'occasion d'un traumatisme (injection, morsure, blessure).

Des insectes aquatiques type punaise ou des arthropodes piqueurs pourraient jouer un rôle de réservoir ou de vecteur. En Australie, l'ulcère de Buruli a été diagnostiqué dans la faune sauvage (koalas, phalangers, potorou) et des animaux domestiques (chevaux, chien et un chat).

Dans une précédente étude chez l'animal avec une peau lésée (approuvée par le comité d'éthique) nous avons démontré une transmission à partir d'un réservoir tellurique. Comme certains micro-organismes sont capables de franchir une barrière cutanée saine (*Francisella*, *Leptospira*) et qu'une recrudescence des cas chez les pratiquants de la riziculture a été observée, nous envisageons la présence d'un réservoir naturel hydrique au contact duquel des individus se contamineraient par l'intermédiaire d'une microlésion ou d'un tissu cutané amolli. Comme il n'y a pas de modèle *in vitro* capable de mimer ces conditions physiopathologiques, l'expérimentation animale est incontournable.

Notre expérimentation consistera à mimer des conditions de la riziculture donc exposer des membres inférieurs et supérieurs de rongeurs (souris) réceptifs à cette maladie, avec ou sans microlésions, à un réservoir hydrique contaminé par cette bactérie pendant 3 heures. Comme dans notre précédente étude, les lésions concerneront l'épiderme et le derme dans des zones non sollicitées pour la préhension et la locomotion des animaux. Ce projet nécessitera un total de 14 animaux (7 mâles et 7 femelles). Pour réduire le nombre d'animaux nécessaires, nous utiliserons 10 animaux "essais" et 4 animaux "contrôles" et les cages seront enrichies avec des dômes et du matériel de nidification. Cette expérimentation se déroulera dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3 ou les conditions d'hébergement (température, humidité, luminosité, eau et nourriture) sont contrôlées.

6583. Dans ce projet nous allons étudier la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour la glycoséose de type III (GSD III). GSD III est une maladie rare caractérisée par une dégénérescence progressive du foie et des muscles. La fréquence de la maladie est de 1/100000. GSD III est une maladie autosomale récessive due à l'absence de l'enzyme de débranchement du glycogène (GDE), enzyme clé dans la dégradation du glycogène.

La maladie se présente en deux phases : une phase juvénile et une phase adulte. Les malades présentent une hépatomégalie, une hypoglycémie, une hyperlipidémie et un retard de croissance. Chez l'enfant la GSDIII affecte principalement le foie. Sans un régime alimentaire approprié les conséquences sont fatales. Chez l'adulte, la maladie a un phénotype musculaire dégénératif plus marqué. Actuellement, il n'y a pas de traitement pour GSDIII mais un régime riche en glucides complexes et en protéines peut ralentir son évolution.

Le but de notre projet est de développer une approche de transfert de gène permettant aux cellules des patients atteints de GSDIII de recréer la protéine GDE manquante. Cette approche vise aussi bien les enfants (phénotype métabolique) que les adultes (phénotype musculaire).

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos virus médicament ont préalablement été testés *in vitro* (Remplacement) et seuls ceux ayant montré la plus importante expression de la protéine GDE seront utilisés *in vivo*. Ceci nous a permis de sélectionner 18 traitements candidats sur 36 potentiels. Toutefois la capacité de nos virus à franchir les défenses immunitaires ne peut être démontrée complètement que dans un organisme physiologique "entier". Nous prévoyons donc de les tester chez le modèle animal qui mime le phénotype musculaire et métabolique de la maladie. Nous prévoyons ainsi de tester nos hypothèses thérapeutiques sur un modèle de souris (souris GDE-KO) présentant les mêmes déficiences observées dans les patients atteints de GSDIII.

La construction de la procédure a été faite pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, puisque au lieu des 503 conditions théoriques à tester, nécessitant 2515 souris, nous nous limiterons à l'utilisation de 280 souris (Réduction)

Le nombre d'animaux par groupe est estimé en fonction d'un test bilatéral standard de comparaison des moyennes afin d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible. Nous envisageons ainsi l'utilisation d'un total de 280 souris sur 5 ans.

Le Raffinement des expériences est assuré par la mise en place des points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris.

Les prélèvements sanguins seront importants pour évaluer l'efficacité de nos vecteurs et seront fait au niveau de la veine mandibulaire afin de raffiner le geste.

Nous espérons ainsi montrer au terme du projet une efficacité thérapeutique de notre meilleur candidat chez la souris permettant la preuve de concept de thérapie génique pour GSDIII. Nous espérons aussi montrer que la séquence humaine est efficace et permettra d'initier un développement clinique de notre produit.

6584. De nos jours, les techniques de transfert embryonnaire sont largement utilisées dans la filière bovine pour l'amélioration génétique. Ces techniques qui consistent à produire plusieurs embryons simultanément chez une femelle donneuse pour les transférer dans l'utérus de femelles receveuses. Pour être efficaces, ces techniques nécessitent la production d'embryons de bonne qualité ainsi que d'un environnement utérin favorable au développement de l'embryon puis du fœtus. Aujourd'hui, la production d'embryons viables est très variable chez les donneuses et le taux de réussite après transfert de ces embryons varie de 30 à 70% en fonction des individus et du mode de production des embryons. Les techniques de transfert embryonnaire nécessitent donc d'être améliorées, notamment par la conduite des animaux. Le projet présenté a pour objectif de mettre au point une méthode de supplémentation alimentaire en acides gras de type oméga-3 de courte durée et d'étudier ses effets sur l'aptitude des femelles à conduire une gestation

à terme après transfert. L'objectif de cette saisine est de réaliser le transfert chez 40 génisses Holstein receveuses d'embryons provenant de vaches supplémentées ou non en oméga-3 selon un protocole croisé (transfert d'embryons produits sous oméga-3 ou non transférés dans des receveuses supplémentées en oméga-3 ou non, et inversement). Les génisses recevront soit un régime supplémenté en oméga-3 (huile de poisson), soit un régime supplémenté en oméga-6 pour les témoins (huile de soja). Grâce à un suivi fin des femelles receveuses (prises de sang, échographies, collecte de fluide utérin), celles qui s'avèreront non gestantes (~20 avec un taux de gestation estimé à 50%) recevront un nouvel embryon. Huit jours après le second transfert, les embryons seront collectés par lavage non invasif de l'utérus et des biopsies de la muqueuse utérine seront également réalisées afin d'évaluer les effets de la supplémentation sur l'environnement utérin. Ce projet respecte la règle des 3R :

**Remplacement** : pour comprendre les effets d'un apport alimentaire enrichi en oméga-3, le recours à un protocole utilisant des bovins (espèce cible pour l'application potentielle en élevage) est nécessaire.

**Réduction** : le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés en répétant les procédures expérimentales sur les mêmes individus. Etant donné le taux de gestation après transfert estimé de l'ordre de 50 %, 4 lots de 10 génisses sont nécessaires pour évaluer les effets de la supplémentation sur la qualité de l'embryon d'une part et sur l'environnement utérin d'autre part.

**Raffinement** : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (présence de brosse pour enrichir le milieu). De plus, des traitements anesthésiques locaux seront réalisés lors des biopsies d'endomètre.

Si les effets positifs de cette supplémentation alimentaire sont confirmés, elle constituera une pratique d'élevage simple à mettre en œuvre dans les élevages désireux d'optimiser les performances de reproduction de leurs femelles, notamment ceux faisant appel aux techniques de transfert embryonnaire.

6585. Les rickettsioses, des maladies infectieuses vectorisées, sont peu étudiées bien que le risque de contracter une rickettsiose dans les pays en guerre ou connaissant une catastrophe naturelle existe toujours. Les génomes des *Rickettsias* (agents causales de rickettsioses) sont de petite taille et une information génétique réduite impose à ces agents infectieux un parasitisme intracellulaire. L'endothélium vasculaire, surtout des petits vaisseaux, est la cible des *Rickettsias* et représente le site privilégié de leur réplique. Le tableau clinique des rickettsioses est polymorphe, se traduisant principalement par de la fièvre, une éruption cutanée, des céphalées et des arthro-myalgies. Les formes sévères des rickettsioses peuvent conduire à des séquelles irréversibles ou au décès des patients. D'un point de vue physiopathologique, les causes majeures de la morbidité et de la mortalité dues aux rickettsioses sont une composante vasculaire source d'hémorragie et de thrombose et une composante inflammatoire caractérisée par un infiltrat de cellules mononucléées (vascularite).

L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de deux molécules antiplaquettaires (Clopidogrel et Ticagrelor) sur l'évolution de la vascularite au cours de l'infection par les rickettsies. Notre approche consiste à développer un modèle murin mimant la vascularite observée chez l'humain puis traiter les animaux infectés par les antiplaquettaires et suivre certains paramètres de la réponse immune, la charge bactérienne ainsi que l'aspect histologique notamment la vascularite au niveau des différents organes. Le suivi de la vascularite sera également fait en microscopie intravivante sur un groupe de souris. Ce modèle murin devrait permettre l'évaluation de l'efficacité de ces deux molécules anti-P2Y12 et ouvrira la voie à des nouvelles approches thérapeutiques. L'utilisation du modèle animal est justifiée pour ce projet car aucune méthode alternative ne permet d'étudier l'impact des molécules antiplaquettaires sur un trouble aussi complexe que la vascularite. Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées, eau et aliments à volonté. Pour le confort des souris, un enrichissement sera mis en place à l'aide du matériel de nidification pour réduire toute angoisse. Par ailleurs les animaux seront suivis quotidiennement pour déceler tout signe d'inconfort et de permettre une action rapide en cas d'atteinte des points limites.

Une étude pilote sera réalisée sur un petit effectif et en cas d'absence de résultats, le projet sera arrêté.

La microscopie intravivante sera réalisée sous une anesthésie générale, et les souris utilisées pour cette procédure seront sacrifiées juste après. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, foie, rate, poumons, ...) après l'euthanasie des animaux.

Pour ce projet 890 souris seront utilisées.

6586. Dans l'espèce caprine, les femelles sont pubères autour de l'âge de 6-7 mois. Néanmoins il a été montré que chez de nombreuses espèces de mammifères, les signaux socio-sexuels échangés au cours des interactions entre les sexes jouent un rôle important dans la régulation de la physiologie et des comportements reproducteurs. Ainsi, des travaux effectués au sein de l'équipe de recherche sur une espèce modèle qu'est la souris ont montré que l'exposition de femelles péri-pubères au mâle permettait d'induire une apparition précoce de la puberté chez ces animaux mais aussi une préférence précoce pour l'odeur du mâle. La puberté avait été évaluée par des marqueurs périphériques (ouverture vaginale, poids du vagin) et centraux (expression hypothalamique du kisséptine). Nous voudrions maintenant tester si de tels effets de l'exposition au mâle sur l'apparition de la puberté chez les femelles existent chez une espèce d'intérêt agronomique telle que la chèvre. En effet cela permettrait à terme d'en tirer des applications pratiques dans le champ des productions animales (raccourcissement de la période dite « improductive » avant la première reproduction, amélioration du comportement sexuel, réponse à l'« effet mâle » lors de la période d'anoestrus) sans utilisation de traitements hormonaux.

Pour cela nous utiliserons 36 chèvres et 12 boucs. Les chèvres seront mises en présence des mâles après leur sevrage, de l'âge de 3 mois à 7 mois (juin à novembre 2015). Afin d'exposer les femelles à des mâles ayant des niveaux d'activité sexuelle différents, une partie des mâles seront castrés. Pour évaluer l'impact de l'exposition péri-pubertaire au mâle, les femelles après le sevrage seront

divisées en 3 groupes, un groupe contrôle non exposé aux mâles, un groupe exposé aux mâles entiers et un groupe exposé aux mâles castrés. Leur comportement sexuel sera évalué en saison de reproduction (octobre/novembre) ainsi que durant la période de repos sexuel suivante (mars/avril) par la réalisation d'un effet mâle. Pour la réalisation de l'effet mâle, nous aurons besoin de mâles sexuellement actifs en contre-saison (mars-avril), les mâles seront donc soumis à un traitement lumineux. En effet chez les caprins la reproduction est sous contrôle photopériodique (durée du jour), les animaux sont sexuellement actifs en jours courts (hiver : généralement plus de 14-16h de nuit pour 10-8h de jour). Le traitement photopériodique de jours longs à compter du 1er novembre permet de mimer la saison d'inactivité sexuelle, qui a normalement lieu en printemps-début d'été, en hiver. Le passage en jours normaux en janvier correspond à une transition jours longs-jours courts permettant ainsi d'activer l'axe reproducteur mâle. Cet effet n'est pas immédiat, mais nécessite plusieurs semaines avant de se manifester (en général 6 semaines), ce qui nous permet d'obtenir des animaux actifs sexuellement en mars, au moment de l'expérience. La plupart des procédures utilisées dans ce protocole sont soit des procédures d'élevage soit des procédures peu invasives et tous les animaux pourront réintégrer le troupeau à la fin de l'expérience.

6587. Nos projets de recherche impliquent des stratégies complexes de régénération tissulaire avec des interactions de biomatériaux et de cellules impliquant des réponses inflammatoires et de communications entre différents types de cellules comme les cellules apportées par les biomatériaux avec les cellules de l'hôte comme les monocytes, les macrophages, les cellules de l'immunité, les cellules osseuses et vasculaires et les cellules souches ...

Les validations de la biocompatibilité *in vitro* et les interactions biomatériaux cellules sont validées avant toute implantation animale afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires à la caractérisation de nos biomatériaux et de nos associations avec des cellules pour réaliser des greffes hybrides, mi synthétiques et mi biologiques, pour la régénération tissulaire.

La médecine régénératrice s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales de moins en moins invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Cette recherche d'une chirurgie mini-invasive a motivé le développement de matériaux supports injectables pour l'ingénierie tissulaire du cartilage et osseuse. Ces matrices injectables doivent également pouvoir durcir une fois implantées et présenter des propriétés mécaniques en relation avec le tissu à réparer. Des polymères ayant un fort pouvoir épaississant dans l'eau peuvent servir à réaliser des hydrogels par pontage physique, ionique ou covalent. Notre domaine actuel de recherche est la régénération des tissus squelettiques comme l'os et le cartilage.

Notre objectif est de développer des hydrogels, biomatériaux à base de biopolymères, supports pour l'ingénierie tissulaire (association de cellules avec un biomatériau) pour le développement de la médecine régénératrice. Les objectifs cliniques sont la régénération du cartilage. Ce tissu, dépourvu de capacités de réparation intrinsèques, nécessite le développement de stratégies thérapeutiques basées sur l'ingénierie tissulaire.

Afin d'améliorer les propriétés mécaniques de ces constructions tridimensionnelles, des renforts participent à l'élaboration, « à façon » des hydrogels. Ces constructions complexes permettront de comprendre le rôle de différents paramètres des biomatériaux sur le comportement de certaines cellules en modélisant l'environnement tridimensionnel de ces cellules. Notre objectif est de construire des matrices extracellulaires synthétiques (Biomatériau hydrogel) modulaires avec des objets fonctionnels compatibles afin de faire varier certains des paramètres de structure du biomatériau. Il s'agit de comprendre comment la structure du gel (taille des pores, hétérogénéité, propriétés dynamiques, fonctions spécifiques...) peut influencer les comportements cellulaires, en particulier la diffusion des cellules.

Afin d'optimiser la formation d'un tissu cartilagineux, les matrices synthétiques seront couplées à des cellules ayant un potentiel de différenciation en cellules cartilagineuses. De précédentes études ont montré que l'hydrogel d'hydroxypropyl méthyl cellulose silanisé (HPMC-Si) développé au sein du laboratoire permettait la prolifération de chondrocytes (de lapin ou humains). Néanmoins, cet hydrogel nécessite d'être renforcé pour en améliorer ses propriétés mécaniques. Pour cela, des nanoparticules sont utilisées et leur biocompatibilité a été testée *in vitro*. Par ailleurs, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) apparaissent comme une source prometteuse de cellules capables de se différencier en chondrocytes. Il paraît important d'étudier la capacité de chondrogenèse de l'association des CSM isolées et induites dans la voie chondrogénique *in vitro* avec des biomatériaux par rapport à celui des chondrocytes couplés aux mêmes biomatériaux.

Ces premiers essais de biocompatibilité et de biofonctionnalité en sous cutané chez la souris avec et sans cellules seront réalisés afin d'établir la preuve de concept en choisissant une construction par indication, l'os ou le cartilage.

Nous disposons de 5 formulations de patch/pastilles à évaluer.

Pour chaque formulation, 6 patch/pastilles seront implantées sans cellules et avec cellules pour chaque temps d'étude (4 et 8 semaines), soit 24 patch/pastilles par formulation.

Le protocole de recherche complet nécessitera donc 120 souris pour tester les 5 formulations.

Nous avons tenu compte des 3R pour la réflexion dans l'élaboration du projet : il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation réalisée par une équivalence *in vitro*. Le nombre de conditions prend en compte la puissance statistique recherchée en réduisant au maximum le nombre d'animaux nécessaires, chaque procédure opératoire est réalisée sous anesthésie générale, précédée d'une analgésie par Buprenorphine et une analgésie post opératoire par Metacam est prévue en cas de souffrance de l'animal constatée. Chaque étape de l'étude est mise en place en tenant compte du bien-être de l'animal de son arrivée dans l'animalerie spécialisée à son sacrifice pour analyse à la fin de l'étude.

6588. Espèce soumise à la prédation dans son milieu naturel, le cheval est un animal sociable qui vit généralement en groupe. Il est exposé, notamment par l'homme, à de nombreuses situations stressantes. Dans certains cas, ces stress négatifs mal gérés peuvent devenir dangereux pour l'homme et pour sa santé. De nombreuses pathologies sont liées au stress : baisse des défenses immunitaires,

problèmes digestifs (perturbation du transit, prolifération de bactéries digestives pathogènes, diarrhées). Ainsi, plusieurs études ont montré l'influence du stress sur la présence d'ulcères gastriques chez le cheval.

C'est pourquoi, disposer de moyens permettant de gérer le stress peut constituer un atout pour le bien-être et la santé du cheval et sécuriser les interactions avec l'homme notamment durant les manipulations (montée dans un van, ferrures, compétitions).

Certaines huiles essentielles (HE) sont bien connues pour limiter le stress : lavande vraie, mandarine, orange douce, bergamote, camomille romaine... Elles sont actuellement utilisées sur les chevaux de façon plus ou moins bien « cadrée » du fait du manque de données scientifiques. En effet, il existe très peu d'études scientifiques concernant l'usage des huiles essentielles chez le cheval et plus particulièrement sur le stress.

De nombreuses études ont montrées l'efficacité de l'HE de lavande vraie (*Lavandula angustifolia* Miller) en cas de stress chez l'homme, la souris... Une seule étude concerne le cheval et montre une réduction du rythme cardiaque après inhalation de 15 min d'HE de lavande en post stress.

Cette expérimentation a pour objectifs d'une part de mettre place un protocole permettant d'évaluer l'efficacité d'HE positionnée avant un stress chez la pouliche sur des marqueurs de stress comportementaux (postures) et physiques (rythme cardiaque, cortisol salivaire) et d'autre part de tester l'influence d'une huile essentielle reconnue pour son activité déstressante.

La pharmacocinétique des principes actifs de l'huile essentielle de lavande (linalol, acétate de linalyle) sera également réalisée.

L'originalité de ce projet réside dans l'évaluation des effets de l'huile essentielle de lavande appliquée avant un stress par des observations comportementales.

La prise en compte de la règle des 3 R :

Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle *in vitro* ou *in silico*.

Réduction : Les études menées avec des tests comportementaux sur des chevaux montrent une variabilité élevée liée au tempérament de l'animal (cf. 3.4.10). Le nombre de 14 pouliches par modalité, soit 28 pouliches au total, nous permet d'envisager d'éventuels cas de retrait.

Aucun dommage ne sera induit sur les animaux, ils retourneront à l'élevage à l'issue de l'expérimentation.

Raffinement : Les chevaux seront hébergés en stabulation par groupe d'une quinzaine et puis dans de grands box situés autour de la stabulation par groupe de 3 ou 4.

Chaque pouliche sera testée pendant une cinquantaine de minutes, une seule fois.

Lors de la procédure de stress (isolement, tests de comportement) en cas d'agitation trop importante mettant en évidence un niveau de stress trop élevé, l'animal sera sorti du dispositif expérimental et remis en contact avec des congénères.

Quelques jours après le début de l'expérimentation, six pouliches seront à nouveau traitées avec l'HE puis des prélèvements sanguins seront effectués.

Si après 3 minutes d'essai, la prise de sang n'a pu être effectuée. Elle ne sera pas réalisée. Tout cheval montrant des signes excessifs de nervosité sera éliminé du dispositif expérimental et remplacé avec ses congénères.

6589. Le foie a une capacité extraordinaire de régénération. Un foie humain normal peut régénérer en quelques semaines plus de 2/3 de sa masse. Mais les patients opérés du foie souffrent souvent de maladies hépatiques qui diminuent fortement les capacités de fonction et régénération simultanées du foie. L'insuffisance hépatique postopératoire est la première cause de mortalité postopératoire (5% à 3 mois) après résection hépatique (environ 5000 par an en France). Actuellement, les limites de la chirurgie de résection sont basées sur des limites établies de manière empirique. Néanmoins, l'évaluation de ce type de seuil est fautive si la situation clinique du foie est inconnue ou si l'intervention chirurgicale apporte des changements importants de l'hémodynamique hépatique. Nous avons choisi le modèle porcin en raison de ses similarités anatomiques fortes avec l'Homme au niveau hépatique. Ce sont tous les deux des monogastriques et leurs processus digestifs sont identiques

Pour ces deux objectifs, des modèles mathématiques de l'organe entier, d'une unité fonctionnelle et de ses composantes microscopiques seront construits avec l'acquisition des données cliniques et expérimentales. Le cadre des modèles multi-échelle qui en résultera nous fournira un outil prédictif pour mieux comprendre comment les données recueillies à des niveaux différents (circulation sanguine, bile et tissu hépatique) reflètent les changements fonctionnels associés aux procédures chirurgicales) et à la régénération hépatique qui s'ensuit.

Remplacement : le processus de régénération hépatique est complexe et aucun modèle *in vitro* ou *in silico* n'est actuellement disponible pour étudier ce processus.

Réduction : 41 porcs au maximum seront utilisés dans ce projet mais une évaluation régulière des données recueillies nous permettra éventuellement de diminuer le nombre total d'animaux expérimentaux. La première phase de ce projet comprend 27 animaux. Elle est actuellement en cours. Nous avons envisagé la réduction du nombre d'animaux dans cette phase à 21. Actuellement nous en avons opéré 21 et nous souhaitons alléger les procédures et compléter cette phase avec les 6 animaux restants pour un total de 27 animaux, comme initialement prévu comme effectif maximal.

Raffinement : Les animaux recevront les soins équivalents à ceux reçus par les patients des services hospitaliers c'est-à-dire antibiotiques, analgésiques puissants, anti-inflammatoires non stéroïdiens, anesthésiques locaux Un enrichissement à base de paille sera proposé. Ces porcs seront suivis quotidiennement, manipulés dans le calme.

6590. L'iléus postopératoire est un problème de santé publique puisqu'il augmente le coût de la prise en charge, en augmentant la morbidité et la durée d'hospitalisation. Sa physiopathologie commence à être en partie connue et il apparaît que le mécanisme de l'iléus implique 3 phases qui sont (i) neurologique, (ii) inflammatoire et (iii) de résolution médiée par le nerf vague. La phase inflammatoire implique la chaîne de l'acide arachidonique et il a été montré que la CycloOxygénase (COX) 2 était précocement

exprimée chez l'humain mais aussi chez la souris. Afin de prévenir l'iléus, des traitements anti-COX sélectifs ou non ont été proposés après résection colique mais il s'est avéré qu'ils entraînaient une augmentation du risque de fistule anastomotique.

Nous avons établi récemment (donnée non publiée) que, dans le colon de patients opérés d'une tumeur colique ou rectale haute, la microsomal prostaglandine E Synthase 1 (mPGES1) était significativement plus exprimée chez les patients faisant un iléus par rapport aux patients ne faisant pas d'iléus. Nous avons également montré que la mPGES1 intervenait dans la motricité intestinale. La mPGES1 est une enzyme qui intervient de manière distale dans la chaîne de l'acide arachidonique et qui permet la synthèse de la prostaglandine E.

Cette enzyme pourrait être une piste prometteuse dans la recherche de cibles thérapeutiques dans l'iléus postopératoire car son blocage permettrait l'arrêt ou la diminution de la prostaglandine E responsable de l'inflammation (et donc probablement de l'iléus), sans bloquer la synthèse de la prostaglandine D qui a un rôle dans la réparation tissulaire. A ce stade, un modèle animal devient nécessaire afin de pouvoir (i) caractériser la cinétique d'apparition et de disparition de la mPGES1, (ii) d'évaluer le transit et l'apparition des iléus chez des souris mPGES1<sup>-/-</sup> et (iii) de tester l'effet de l'anti-mPGES1 dans la prévention ou le traitement de l'iléus.

Tout en tenant compte du principe des 3R (remplacement quand possible, limitation des effectifs (3-4 animaux par groupes), raffinement des conditions d'hébergement des souris, utilisation d'animaux d'élevage n'ayant pas le « bon génotype »), nous mettrons tout d'abord en place un modèle d'iléus postopératoire chez la souris. Nous observerons la reprise du transit gastrointestinal suite à cet iléus. Lorsque le modèle sera au point, nous observerons les effets liés à l'absence de la mPGES1 à partir de souris KO mPGES1<sup>-/-</sup>.

Les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera au total 200 animaux maximum.

6591. Depuis l'époque de Pasteur, on peut définir 3 générations de vaccins : Les vaccins vivants atténués, inactivés ou tués qui consistent, comme leur nom l'indique, à injecter les pathogènes atténués, inactivés ou tués en vue d'induire une réponse immunitaire permettant à l'organisme de se défendre en cas de contact ultérieur avec le pathogène vivant. Les vaccins sous unitaires qui, plutôt que d'être constitués par les agents pathogènes en entier, sont composés uniquement d'antigènes spécifiques, généralement présents à la surface des pathogènes. Enfin les vaccins géniques qui consistent à introduire directement dans certaines cellules de l'organisme le gène codant l'antigène. L'antigène vaccinal est alors produit localement, sous sa forme native, par l'organisme de l'individu à immuniser et est donc en tout point similaire à l'antigène synthétisé lors d'une infection

Les vaccins géniques représentent donc les vaccins de demain de par leurs nombreux avantages : simplicité de mise en œuvre, peu coûteux, vaccination multi épitopes, chaîne du froid non obligatoire, profil sécuritaire important. Néanmoins, jusqu'à présent, si les premiers essais chez l'homme ont permis de démontrer que les vaccins géniques étaient bien tolérés et sûrs ils ont échoué à montrer l'induction d'une réponse immunitaire efficace. Ils nécessitent, en outre, des quantités d'acides nucléiques très importantes. Pour permettre leur développement, des stratégies d'optimisation ainsi que des adjuvants sont nécessaires, afin d'améliorer la réponse immunitaire tout en continuant à décrypter les mécanismes mis en jeu lors de la vaccination génique. Des vecteurs (un type d'adjuvant) ont été développés afin d'améliorer de manière très importante le transfert de ces acides nucléiques au sein des cellules tout en diminuant fortement la quantité d'acides nucléiques nécessaires. Certains de ces vecteurs ont déjà démontré leur efficacité, notamment dans le cadre de vaccins à ADN prophylactiques et thérapeutiques. Néanmoins, une nouvelle approche reposant sur l'utilisation d'ARN en lieu et place de l'ADN, est apparue et suscite un intérêt croissant de par son meilleur profil sécuritaire (pas de risque d'intégration génomique) que l'ADN. Cependant, de la même manière que pour l'ADN, ces ARN passent très difficilement la membrane des cellules et des vecteurs sont nécessaires afin d'améliorer leur transport dans le cytoplasme de celles-ci.

Afin de limiter le nombre de test *in vivo*, un premier screening de vecteurs est effectué *in vitro*. Après cette première sélection, l'usage d'un modèle *in vivo* à ce niveau de notre recherche est indispensable afin d'évaluer le comportement de nos vecteurs synthétiques lors d'une injection intramusculaire. En effet, l'influence de l'environnement (organe, sang) *in vivo* tant par sa mécanique que par sa composition peut entraîner des modifications de comportement que l'on ne peut évaluer *in vitro*. L'évaluation des vecteurs sera effectuée dans la même souche de souris, au même âge et même sexe dans le but de pouvoir les comparer entre eux et de ne pas renouveler les contrôles déjà effectués. La mise en place de ce projet répondra à de nombreuses questions avant de pouvoir envisager l'usage de ces systèmes chez l'homme. Selon les données antérieures de l'équipe (nombres de vecteurs validés *in vitro*, conditions testées), on peut estimer à 520 le nombre de souris utilisées sur les 5 ans. Enfin, les souris seront hébergées par groupe de 5 dans des cages avec enrichissement sous forme de nid en vue du raffinement.

6592. Le gène SPNA1 code pour la spectrine, une protéine du cytosquelette. Il est situé chez le bovin dans une région chromosomique associée à une variation de la fertilité chez la femelle. De plus, nous avons observé des différences d'expression de ce gène lors de la maturation *in vitro* de l'ovocyte chez le bovin mais aussi chez la souris. Chez le mâle, la spectrine est aussi exprimée dans le testicule et son rôle n'est pas clairement défini. Ainsi, l'objectif de notre projet est d'étudier plus en détails le rôle de la spectrine *in vivo* dans l'ovaire et le testicule chez la souris. Pour cela nous souhaitons déléter le gène SPNA1 dans l'ovocyte mais aussi dans les cellules de sertoli (cellules du testicule) puis étudier les différents paramètres de fertilité chez ces animaux transgéniques. Sur les 5 années du projet nous aurons besoin d'un total de 140 souris contrôle ou transgéniques sachant que pour les obtenir, il sera nécessaire de générer environ 560 souris. L'utilisation des animaux lors de nos expérimentations s'effectuera dans le respect de la règle des 3R : -Remplacer : la souris est l'espèce modèle de mammifère pour la transgénèse.

-Réduire : des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de chacune des expériences.

-Raffiner : les animaux seront élevés dans un milieu enrichi (introduction de tunnels et de plancher Loft dans les cages), toutes les interventions nécessaires à l'expérimentation seront réalisées par un personnel compétent.

6593. En élevage bovin laitier, un des problèmes majeurs des vingt dernières années est une baisse importante de la fertilité des vaches laitières hautes productrices qui reste actuellement assez faible (taux de réussite à la 1ère insémination animale (IA) d'environ 35-40 % chez les vaches Prim'Holstein). Des résultats préliminaires du laboratoire montrent que l'ajout d'Acides Gras PolyInsaturés (AGPI) oméga-3 à longue chaîne (AGPI n-3) dans la ration alimentaire de vaches laitières permet d'augmenter nettement leur fertilité : le taux de gestation à 35 jours après insémination est de 85 % chez les vaches recevant des AGPI n-3 et de 60 % chez les vaches du groupe témoin (recevant des AGPI n-6). Ce projet a pour objectif technologique de mettre au point une méthode utilisable sur le terrain de supplémentation alimentaire en AGPI n-3 de courte durée et favorable à la fertilité. Ce projet a également pour objectif scientifique d'étudier les effets de ces AGPI n-3 sur la compétence ovocytaire et la qualité embryonnaire, grâce à des expérimentations de fécondation *in vitro* et de transfert embryonnaire. Le projet a enfin pour objectif d'identifier les cibles de ces acides gras (ovaires, utérus), et d'en comprendre les mécanismes d'action. Ce projet consistera à compléter 2 lots de 22 vaches Prim'Holstein primipares en acides gras oméga3 ou 6 (lot témoin) et à réaliser 5 sessions de ponctions de follicules ovariens réalisées sous échographie (comme chez la femme) sur ces vaches afin de mesurer l'impact de la supplémentation sur la qualité de l'ovocyte. Remplacement : il n'y a pas de méthode de remplacement, le recours à un protocole utilisant des bovins (espèce cible pour l'application potentielle en élevage) est nécessaire.

Réduction : le nombre de 22 vaches/lot (soit 44 vaches au total) est nécessaire pour collecter suffisamment de matériel biologique (ovocytes) pour la production d'embryons *in vitro* et pour les analyses moléculaires.

Raffinement : les vaches sont hébergées (en stabulation libre sur aire paillée, avec des brosses à disposition) et suivies dans leur structure d'élevage habituelle, et une anesthésie loco-régionale est pratiquée lors des ponctions sous échographie.

6594. L'Azaspiracide-1 (AZA-1) fait partie d'une famille de phycotoxines produites par certaines espèces phytoplanctoniques et peuvent engendrer des toxi-infections alimentaires chez l'homme via la contamination de fruits de mer. Peu de données sont disponibles aujourd'hui quant à la toxicité de l'AZA-1 et en particulier quant à son potentiel génotoxique c'est-à-dire sa capacité à altérer le génome du vivant *in vivo*. Nos précédentes Des études au laboratoire ont montré une certaine capacité de l'AZA-1 à provoquer des lésions de l'ADN dans certains types cellulaires. Aussi, pour mieux caractériser le risque pour l'homme associé à l'exposition exposé par voie alimentaire à cette toxine, des études complémentaires sont nécessaires en particulier des études de génotoxicité *in vivo* qui sont prédictives du potentiel cancérigène. Donc après détermination de la dose maximale tolérable de l'AZA-1 par la souris, le but de cette l'étude principale est de réaliser différents tests de génotoxicité après administration orale à des souris de la toxine. La pré-étude de toxicité aiguë permettant de déterminer la dose maximale tolérable sera réalisée sur quelques animaux (10) afin de déterminer les niveaux de doses pour l'étude principale. Le nombre d'animaux ici est réduit au maximum et suit les recommandations des lignes directrices européennes. Un point limite a été défini et les animaux seront euthanasiés dès que ce point limite sera atteint. Dans l'étude principale, les doses administrées sont faibles et ne devraient pas entraîner de souffrance chez les animaux. Au total, 46 animaux seront utilisés. Le nombre d'animaux ici est réduit au maximum et suit les recommandations des lignes directrices internationales et ne peut pas être diminué sous peine de ne pouvoir effectuer une analyse statistique satisfaisante via une analyse de la variance.

6595. Le syndrome métabolique (SMet) est défini par une association de facteurs de risque cardiovasculaire liés à un dérèglement métabolique : obésité androïde, glycémie à jeun élevée et/ou insulino-résistance, dyslipidémie (haut taux de triglycérides et/ou bas taux de HDL) et pression artérielle élevée. Il est responsable d'une morbi-mortalité conséquente et touche près d'un individu sur trois dans le monde.

Les inhibiteurs de phosphodiésterases (PDE), enzymes qui interviennent dans de très nombreuses voies intracellulaires, ont montré des effets bénéfiques au niveau cardiovasculaire. Les inhibiteurs de PDE5, qui inhibent de façon majoritaire le clivage du guanosine monophosphate cyclique (GMPc), ont été très étudiés notamment grâce au sildénafil, composé actif du Viagra, qui avait pour but de traiter l'insuffisance cardiaque mais qui finalement s'avère être efficace pour traiter les troubles de l'érection et l'hypertension artérielle pulmonaire. En plus des propriétés cardioprotectrices et antihypertensives très bien documentées à ce jour, des études récentes ont montré que le sildénafil jouerait un rôle dans la sensibilité à l'insuline, dans l'adipogenèse et aurait des propriétés antioxydantes. Cependant, les inhibiteurs de PDE5 possèdent une très courte durée d'action et seraient inefficaces s'il n'y a pas ou peu de synthèse basale de GMPc. Il existe une famille de molécules, récemment étudiée, qui stimule la guanylate cyclase soluble (GCs), enzyme cytosolique dont l'activation permet la synthèse de GMPc. Les stimulateurs de cette enzyme, comme le riociguat, ont eux aussi montré des effets bénéfiques au niveau cardiovasculaire. Leur utilisation simultanée avec les inhibiteurs de PDE5 pourrait s'avérer une option thérapeutique attractive en raison de la complémentarité de leur mode d'action.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un traitement avec un inhibiteur de PDE5 ou un stimulateur de GCs inhiberait (ou limiterait) le développement du SMet (composante cardiovasculaire) en régulant à la hausse le taux de GMPc. De plus, leur association permettrait un effet synergique.

Parmi tous les modèles de SMet disponibles, le modèle du rat spontanément hypertendu (SHR) soumis à un régime hypercalorique de type « cafeteria » (RHC) semble être approprié à ce que l'on retrouve chez l'Homme. En effet, il réunit certaines conditions (insulino-résistance, dyslipidémie) et il est surtout très intéressant de par sa composante génétique impliquée dans le développement de l'hypertension artérielle.

Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est d'explorer les effets préventifs potentiels d'un inhibiteur de PDE5 (sildénafil) et d'un stimulateur de la GCs (riociguat), seuls ou en association, sur les fonctions cardiaque et vasculaire (en évaluant le débit oculaire, la réactivité de l'artère rénale et de l'aorte) dans un modèle de SMet chez le rat SHR soumis à un RHC.

5 groupes de 10 rats sont utilisés :

- 1) un groupe témoin de rats SHR
- 2) un groupe de rats SHR soumis à un RHC ;
- 3) un groupe de rats SHR soumis à un RHC et traités avec un inhibiteur de PDE5 (sildénafil) ;
- 4) un groupe de rats SHR soumis à un RHC et traités avec un stimulateur de GCs (riociguat) ;
- 5) un groupe de rats SHR soumis à un RHC et traités avec un inhibiteur de PDE5 (sildénafil) associé à un stimulateur de GCs (riociguat).

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R. Le modèle du syndrome métabolique induit par un RHC chez le rat SHR est désormais maîtrisé dans notre équipe. On ne peut envisager d'étudier exclusivement par des approches *in vitro* sa physiopathologie et les conséquences cardiovasculaires qui lui sont associées. De plus, il n'existe pas de modélisation mathématique ou *in silico* qui permette d'évaluer l'effet de traitements dans ce domaine. Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude à l'aide d'une grille de score adaptée pour le rat. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

6596. Ce projet a pour but la fabrication d'anticorps monoclonaux - essentiellement antiviraux - pour la mise en évidence de virus sur des prélèvements biologiques humains (Kits de diagnostic) ou pour la recherche. Les cellules tumorales, productrices d'anticorps (hybridomes) sont préférentiellement cultivées *in vitro*. Certains hybridomes, cependant, n'ont qu'un faible voire très faible rendement. La culture *in vivo*, sur souris, peut se révéler alors incontournable. Elle s'effectuera en liquide d'ascite, sur souris. Cette méthode éprouvée, qui permet l'obtention de solutions concentrées d'anticorps, consiste à provoquer une inflammation de la cavité péritonéale (amorce intra-péritonéale) où l'on injectera les hybridomes. En quelques jours, une ascite (épanchement de liquide dans la cavité péritonéale) se développe, sensiblement plus concentrée en anticorps qu'un surnageant de culture *in vitro*. La souris est alors euthanasiée et l'ascite est récoltée par drainage de la cavité péritonéale. Cette méthode, peut cependant induire quelque douleur à l'animal, en rapport avec les injections, l'accumulation du liquide d'ascite, le développement éventuel de tumeurs abdominales. Douleur de niveau léger à sévère, c'est pourquoi elle ne sera mise en œuvre que dans la mesure où les méthodes de remplacement (production "*in vitro*"), n'apporteraient pas des résultats techniquement satisfaisants. D'autre part, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au strict minimum, en rapport direct avec les quantités (en milligrammes d'anticorps) à produire et au rendement attendu pour l'hybridome donné. Afin de minimiser le degré de souffrance de la souris, nous avons opté pour des procédures de raffinement, plus soucieuses du bien-être animal et mis en place un suivi rapproché de ceux-ci tout au long de l'expérimentation. Nous estimons avoir recours, au maximum, à 300 souris/an.

6597. Notre société de biotechnologies développe des petites protéines d'affinité, capables de reconnaître et de se fixer à une molécule biologique, circulante ou fixée à une cellule eucaryote ou un micro-organisme, ou bien intracellulaire. Ces petites protéines d'affinité peuvent être générées à façon et constituent une alternative thérapeutique aux anticorps. Obtenues par ingénierie à partir de bactéries thermophiles issues de source hydrothermales (pH, température extrêmes), elles présentent de nombreux avantages comme une stabilité accrue. Leur taille est 15-20 fois plus petite qu'un anticorps monoclonal et de ce fait (1) leur pénétration tissulaire est potentiellement plus élevée et (2) cela permet d'envisager des voies d'administration alternatives (traitements topiques, administration orale) pour des pathologies pour lesquelles les anticorps sont administrés par voie intraveineuse. L'objectif du projet est d'évaluer l'effet thérapeutique anti-tumoral de nos protéines d'affinité chez la souris. Deux procédures font l'objet de cette demande d'autorisation (comportant un nombre total de 97 souris).

La première procédure expérimentale consiste en une étude de la pénétration tumorale des molécules (étude du profil de fixation dans les tumeurs en termes de cinétique et de distribution => 37 souris). Des tumeurs de cellules humaines seront implantées par voie sous-cutanée chez des souris femelles immunodéficientes Balb/c Nude (groupes de 5 souris). Une fois les tumeurs implantées, les protéines d'affinité à tester seront injectées par voie intraveineuse (1 protéine spécifique à une dose fixe jusqu'à 6 timepoints entre 0 et 24h post-injection soit jusqu'à 6 groupes possibles ; et 2 groupes contrôle (contrôle protéine irrelevante et contrôle véhicule sur 1 timepoint)). Les tumeurs seront ensuite prélevées après sacrifice des animaux sous anesthésie générale. Leur fixation dans les tumeurs sera évaluée par analyses immunohistochimiques. Pour faciliter leur détection, les molécules injectées auront été préalablement couplées à des fluorophores.

La seconde procédure consiste en une étude de l'efficacité anti-tumorale de nos molécules d'affinité. Les tumeurs seront implantées comme précédemment décrits (=> 60 souris). Une fois les tumeurs implantées, les protéines d'affinité à tester seront injectées par voie intraveineuse (6 groupes de 10 souris : 2 protéines spécifiques à 2 doses différentes, 1 protéine irrelevante et un contrôle véhicule). Le volume de la tumeur sera évalué 3 fois par semaine sur une durée minimale de 3 semaines, en complément de l'observation quotidienne de l'état général des animaux. Les souris seront euthanasiées sous anesthésie générale lorsque le volume atteindra 2,000mm<sup>3</sup>. L'efficacité des molécules sera évaluée au travers de courbes de survie tracées selon la méthode de Kaplan Meier. Des analyses immunohistochimiques pourront être réalisées sur les tumeurs prélevées après sacrifice.

Concernant la procédure expérimentale 1, des groupes de 5 souris seront nécessaires pour réaliser des analyses statistiques (assez peu de variabilité d'implantation ayant été observée entre les souris). Concernant la procédure expérimentale 2, des groupes de 10 souris seront nécessaires pour réaliser les courbes de survie, comme il est classiquement décrit dans la littérature.



L'état général des animaux sera surveillé quotidiennement, la croissance des tumeurs évaluée 3x/semaine et le poids des souris contrôlé 2x/semaine. Les points limites concernant la prise en compte du bien-être animal sont disponibles en annexe de cette saisine. L'euthanasie ne sera réalisée que sous anesthésie générale par kétamine (100mg/kg) - xylazine (16mg/kg), par dislocation cervicale. La méthode d'implantation des tumeurs décrites dans ce projet a déjà été précédemment optimisée dans le cadre d'une étude de la biodistribution de nos molécules par imagerie fonctionnelle. Il ne sera donc pas nécessaire d'utiliser des animaux pour la mise en place du modèle tumoral. Si toutefois une optimisation du modèle d'implantation des tumeurs s'avérait nécessaire pour d'autres lignées, un lot de raffinement de 18 souris pourra être envisagé optionnellement (ajustement du nombre de cellules implantées et du délai d'implantation entre les deux lignées).

Nos molécules seront sélectionnées sur les critères d'efficacité et d'innocuité. Alternativement elles pourront être sélectionnées sur leur capacité à être utilisées dans des schémas thérapeutiques alternatifs aux anticorps. Dans ce contexte, la procédure expérimentale 2 pourra être répétée : les molécules seraient alors administrées par voie orale, topique, IP ou intratumorale à la place de la voie intraveineuse. C'est pourquoi la durée de ce projet est demandée sur une période de 5 ans.

6598. Les tests décrits dans ce projet permettent l'évaluation de l'effet des substances sur le système respiratoire : effet secondaire dans le contexte de la pharmacologie de sécurité ou modèle d'efficacité tel que des modèles d'asthme par exemple.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre au sein du laboratoire.

Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substance pharmacologiques sur la fonction respiratoire d'animaux vigiles. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 3000 rats, 2000 cobayes, 500 souris, 100 chiens.

Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

6599. La *Leishmania* est l'agent pathogène responsable de la leishmaniose qui est parmi les infections parasitaires, l'une des principales causes de mortalité dans le monde après le paludisme. Selon la dernière estimation de l'OMS, plusieurs millions de personnes vivent aujourd'hui avec la leishmaniose et les traitements actuels s'avèrent assez toxiques.

L'incidence de l'infection par la *Leishmania* est particulièrement élevée dans les pays en voie de développement. En l'absence d'un vaccin préventif, développer des moyens de prévention efficace demeure une priorité pour limiter la propagation du parasite et réduire les réservoirs tissulaires.

Des travaux récents ont montré que l'infection par *Leishmania infantum* chez le primate non humain (PNH) conduisait, comme chez l'homme, à une atteinte et une dissémination du parasite dans l'organisme.

L'objectif de ce projet vise : 1) à étudier les mécanismes physiopathologiques de l'infection par *Leishmania infantum* et l'établissement des réservoirs tissulaires du parasite ; 2) à évaluer in-vivo l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques capables de traiter la leishmaniose.

Le modèle choisi est le PNH et plus précisément, le macaque rhésus (*Macaca mulatta*). C'est le modèle le plus pertinent pour étudier les paramètres immunologiques en réponse à l'infection par *Leishmania infantum* et également pour corrélérer les paramètres pharmacocinétiques des molécules thérapeutiques à ceux qui seront obtenus chez l'homme.

Le projet prévoit au maximum 40 animaux qui proviendront d'un élevage agréé. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de données statistiquement interprétables. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (grille d'évaluation du stress et de la douleur, administrations sous anesthésie quand nécessaire, limitation des volumes prélevés).

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long des études (suivi clinique, poids, température) afin de détecter tout signe de douleur et/ou détresse. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de l'arrêt de l'étude en cours si des effets inattendus apparaissent.

Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupe sociaux dans des volières en acier et plexiglas puis par groupe thérapeutique et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal.

6600. *In vivo* les composants de la matrice extracellulaire comme le collagène subissent, lors du vieillissement ou lors de conditions physiopathologiques des modifications non enzymatiques post-traductionnelles. Ce projet permettra d'étudier l'étendue de ces modifications à partir de prélèvements sanguins et des protéines extraites de tendons de queue de rat ou à partir d'autres prélèvements. Pour fixer les paramètres de progression du vieillissement, trois âges ont été retenus : 15 jours (nouveau-né), 8 semaines (adulte) et 24 mois (âgé). Ces prélèvements permettront l'étude de la mise en évidence des interactions des cellules tumorales avec son microenvironnement à différents stades de maturité. Le projet, sur une durée de 5 ans, comptera 200 rats, 200

rats adultes et 200 rats âgés. La colonie sera maintenue à l'animalerie dans des conditions d'alimentation standard ou enrichie. Ce maintien jusqu'à l'âge souhaité pourra entraîner des troubles tels que des ulcérations des pattes et/ou une réduction de l'activité dues au surpoids de l'animal, l'apparition de kystes, une croissance anormale des dents ou une polydipsie. La taille des cages, les soins et la surveillance seront adaptés en conséquence et suivant la réglementation en vigueur. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie profonde afin d'éviter la douleur.

6601. L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques est ici à visée pédagogique, elle sert à mettre en évidence, pour les étudiants dans le cadre de leur formation, l'effet de substance psychotrope non toxique *in vivo* chez l'animal. Pour étudier une substance psychotrope, médicament qui agit principalement sur le fonctionnement du système nerveux central, de nombreux tests comportementaux sur animaux sont employés et il n'est pas possible de les remplacer par une méthode non-animale.

Les animaux sont déplacés de l'animalerie et stabulés vers une salle isolée spécialement dédiée aux manipulations 3 heures avant le début de la séance afin de les habituer à leur environnement. Les tests sont réalisés dans cette même pièce afin de limiter le bruit et leur stress. Les animaux sont placés dans des cages individuelles avec de la litière entre les tests de comportement. Des petites aiguilles pour sous-cutané (27G) sont utilisées pour les administrations. Chaque administration est réalisée avec une aiguille neuve. Des tests de comportement seront mis en œuvre après injection en intrapéritonéal de 5 substances à un total de 750 souris Swiss réparties sur 5 ans afin d'évaluer l'effet des substances sur l'activité globale de l'animal (déprimée, augmentée), sur la curiosité, le comportement exploratoire, l'anxiété, les possibilités d'apprentissage, le conditionnement, le tonus musculaire, l'équilibre ou la coordination motrice. Les souris témoins ou ayant reçue une substance à peu d'effet mémoire seront réutilisées au cours d'une deuxième séance afin de réduire le nombre total d'animaux. Des souris de même genre seront privilégiées dans les cages afin de limiter les agressions dans les cages collectives lors du retour à l'animalerie en salle de quarantaine.

6602. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre le niveau intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la capacité de détoxification des systèmes antioxydants de la cellule. Une des caractéristiques des cellules cancéreuses, par rapport aux cellules normales, est la persistance d'un état pro-oxydant qui favorise la croissance tumorale. Cependant le niveau basal intracellulaire élevé de ROS rend les cellules cancéreuses hautement dépendantes de leurs systèmes antioxydants et diminue leur seuil de tolérance à un stress oxydant exogène. Le but de notre projet de recherche est de développer une stratégie thérapeutique anticancéreuse basée à la fois sur la modulation de l'état redox et sur la génération de ROS. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser un inhibiteur de la thioredoxine réductase (TrxR), enzyme clé du système antioxydant cellulaire, en combinaison soit avec 1) une molécule génératrice de ROS ; soit avec 2) une molécule antioxydante. Nous espérons, grâce à l'utilisation de ces deux combinaisons, éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses et démontrer ainsi la faisabilité de notre stratégie thérapeutique.

Règle des 3Rs (Remplacer, Réduire, Raffiner) –

1/ Remplacer les animaux : Pour des raisons scientifiques et éthiques, nous répondons au plus grand nombre de questions à l'aide d'expériences réalisées *in vitro*. Le recours à l'expérimentation animale est cependant indispensable pour confirmer et valider nos résultats. En effet, nos données obtenues *in vitro* révèlent un effet anticancéreux de la combinaison auranofin/bêta lapachone sur des lignées de cancer de sein très agressives. Il est donc primordial pour nous de valider cet effet sur un modèle animal avant d'envisager l'élaboration d'un éventuel traitement qui sera administré aux patients.

2/ Réduire le nombre de souris utilisées : Un nombre minimum d'animaux est nécessaire dans chaque lot afin de pouvoir valider les résultats de façon statistique. Nous récupérerons un maximum de données sur une même souris (vitesse d'apparition de la tumeur, taille de tumeur, purification des cellules issues de la tumeur). Cette méthode nous permettra de réduire le plus possible le nombre de souris utilisées, tout en préservant la qualité de la recherche menée.

3/ Raffiner les méthodes : les souris seront hébergées en petits groupes dans un milieu enrichi pour réduire le stress, avec eau et nourriture à volonté. Comme ce sont des souris immunodéficientes, donc sensibles aux infections, leur cage est placée dans un isolateur stérile qui les protège de toute contamination. Lors de l'injection des cellules cancéreuses, les souris sont anesthésiées puis remises en groupes pour le réveil (durée de l'intervention : quelques minutes). Chaque souris ne subit qu'une seule injection de cellules au cours de sa vie. Le développement tumoral est observé tous les 2 à 3 jours et les souris sont euthanasiées par une méthode rapide générant le moins de douleur possible (dislocation cervicale) dès qu'un signe de douleur, angoisse, souffrance est détecté. Si aucun signe n'est détecté, c'est le diamètre de la tumeur (17 mm) qui conditionne le sacrifice.

Globalement ces expériences nécessiteront 258 souris.

6603. La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune caractérisée par une fibrose touchant la peau et les organes internes et une atteinte des vaisseaux touchant la microcirculation (microangiopathie) évoluant vers une occlusion vasculaire et qui se manifeste cliniquement par le syndrome de Raynaud et dans les formes graves par une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Les patients atteints de ScS ont un risque de décès multiplié par 3,5 par rapport à une population saine appariée. La fibrose pulmonaire et l'HTAP constituent les deux causes principales de décès dans cette maladie.

Malgré les progrès récents dans les connaissances physiopathologiques de la maladie, il n'existe pas de traitement permettant de traiter efficacement les complications vasculaires et la fibrose liées à la ScS. Les travaux préliminaires de notre équipe ont identifié 3 cibles principales dans cette maladie et l'intérêt de ces cibles dans la ScS a été conforté par des expérimentations préliminaires *in vitro* : la première est impliquée dans l'auto-immunité, la seconde dans le remodelage de la matrice extracellulaire et la troisième dans la régulation de l'activation des fibroblastes.

Notre objectif est d'étudier *in vivo* le rôle de ces cibles dans un modèle murin original de ScS, la souris transgénique pour le facteur de transcription fra-2, seul modèle reproduisant les atteintes sévères de la ScS que sont la fibrose pulmonaire et l'HTAP, avec une séquence temporelle identique à celle de la maladie humaine. Le remplacement est impossible, il n'existe pas d'autre alternative préclinique d'évaluation de molécules prometteuses dans la ScS.

160 souris seront nécessaires à cette étude (80 souris transgéniques pour Fra-2 et 80 souris contrôles de même fond génétique C57/BL6 non transgéniques pour Fra-2). Les animaux recevront les traitements par voie orale ou par injection et après 4 semaines de traitement, les souris seront évaluées sur le plan pulmonaire (scanner pulmonaire) avant d'être sacrifiées pour analyse histologique. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. L'utilisation d'un seul modèle regroupant les différentes atteintes de la maladie est un atout majeur permettant de diminuer le nombre d'animaux utilisés, évitant d'utiliser des modèles murins différents pour chacune des atteintes.

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant des comparaisons statistiques cohérentes.

Le scanner pulmonaire sera réalisé sous anesthésie à l'isoflurane 3% afin de limiter l'angoisse infligée aux souris.

Une stratégie d'observation quotidienne sera mise en place afin d'évaluer la douleur, la souffrance, et l'angoisse. La présence d'au moins un point limite de grade 1 (perte de poids entre 10 et 25%, isolement, altération de la réponse aux stimuli, poils hérissés) conduira à l'arrêt de l'expérimentation sur l'animal et à sa surveillance. Un antalgique sera prescrit en cas de symptôme douloureux. La présence d'au moins un point limite de grade 2 (perte de poids >25%, mutilation, absence de réponse aux stimuli, souillures, atrophie de la musculature dorsale) conduira à l'arrêt de l'expérimentation sur l'animal et à l'euthanasie par dislocation cervicale. L'observation de points limites de grade 2 chez 20% des animaux, conduira à l'arrêt du projet.

Ce travail devrait permettre de mieux préciser la physiopathologie de la ScS et en particulier de ses atteintes sévères, avec pour objectif de développer des traitements efficaces.

6604. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont responsables de la première cause de handicap de l'adulte, de la deuxième cause de démence et de la troisième cause de mortalité. L'infarctus cérébral (IC) représente près de 80% des AVC. Il est secondaire à l'occlusion d'une artère intracrânienne par un thrombus.

L'administration d'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA, Actilyse) par voie intraveineuse (IV) et la thrombectomie interventionnelle sont les traitements recommandés à la phase aiguë de l'IC et à une dilution dans tout le compartiment sanguin avec comme corolaire une faible concentration au niveau du thrombus. Un traitement adjuvant associé au rt-PA IV pour en augmenter son efficacité thrombolytique, diminuer le risque hémorragique et élargir la fenêtre thérapeutique représenterait une avancée majeure dans la prise en charge de ces patients.

La recanalisation aiguë mécanique et/ou médicamenteuse des infarctus cérébraux, s'accompagne d'un stress oxydatif augmenté, avec comme principal effecteur, une forte activation des globules blancs. Ces lésions de reperfusion font perdre une partie du bénéfice de la recanalisation et provoquent des problèmes hémorragiques. L'addition d'un traitement adjuvant qui limite l'activation des globules blancs est potentiellement d'intérêt dans les cas d'ischémie-reperfusion cérébraux et en particulier dans la prévention de la transformation hémorragique.

En plus d'expériences menées *in vitro*, nous aurons recours à des expériences *in vivo* dans différents modèles d'ischémie cérébrale expérimentale dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous anticipons un besoin d'environ 400 rats et 100 souris pour la réalisation des différents protocoles expérimentaux. Ce nombre a été déterminé de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Les procédures comportent des gestes de chirurgie limitée (exposition de l'artère carotide) et l'induction d'infection. Les dommages prévisibles sont la douleur post-opératoire et l'inconfort lié à l'induction de l'infection. La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie et avec analgésie au décours pour maîtriser la douleur post-opératoire, et l'infection sera très régulièrement suivie pour surveiller le confort des animaux. Ainsi, les critères de traitement pour soulager l'animal ou les critères d'arrêt définis seront appliqués à temps pour éviter toute souffrance inutile. L'avantage attendu de ce projet est de définir l'efficacité du rt-PA IV est limitée par un faible taux de recanalisation en cas d'occlusion d'une artère de gros calibre. Son efficacité est confrontée à différents problèmes pharmacologiques, notamment à la présence de facteurs anti-fibrinolytiques

6605. Les personnes prises en charges à l'hôpital suite à traumatisme sévère comme par exemple une blessure de la colonne vertébrale (= traumatisme médullaire), suite à un accident de la route, développent très fréquemment des pneumonies (infections pulmonaires) suite à une baisse transitoire des défenses de l'organisme (système immunitaire) dite d'immunosuppression. Il est connu que le système nerveux module et influence le système immunitaire. Par différentes études, il a été découvert que les patients ayant un traumatisme médullaire (SCI) ont une phase d'immunosuppression (« défaillance » du système immunitaire) dans laquelle les lymphocytes T du système immunitaire sont dans un processus dit d'exhaustion. C'est un processus où les lymphocytes T perdent leur habilité à tuer des cellules cancéreuses, ou des cellules infectées par des microbes. Ces cellules ont alors une augmentation de l'expression du récepteur 1 de mort programmée (PD-1), contribuant à cet état d'immunosuppression. Cette réponse du système immunitaire par l'expression excessive de PD-1 pourrait être à l'origine de l'incapacité des malades dans les services de réanimation, à réagir contre une infection bactérienne, expliquant ainsi l'augmentation de leur susceptibilité à l'infection. En oncologie, l'immunothérapie par anti-PD1 est d'actualité et montre dans le mélanome des résultats prometteurs, et des études similaires sont effectuées dans d'autres cancers. En traumatologie, l'immunothérapie a été pour le moment effectuée sur des modèles de septicémie (infection d'un microbe dans l'ensemble du corps). A l'arrivée de nos nouveaux résultats, l'immunothérapie par anti-PD1 sera testée sur notre modèle de murin de traumatisme médullaire (SCI). Les objectifs de cette étude seront de poursuivre notre étude de

l'immunosuppression (IS) dans un modèle murin de traumatisme médullaire en mettant en place une immunothérapie précoce, afin d'éviter une infection de ses animaux et donc éviter qu'ils ne meurent d'infection opportuniste. Cette étude se divise en 2 parties : 1- Evaluer la dose d'anti-PD1 à injecter pour une meilleure survie des animaux SCI, suite à une pneumonie à *Staphylococcus aureus* ; 2- Rôle et modulation du système immunitaire suite au traitement avec l'anticorps anti-PD1, dans notre modèle murin. Pour cela, 484 souris seront utilisées au cours de ce projet qui se divise en 2 parties. Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). La corrélation *in vitro-in vivo* n'étant pas satisfaisante, le recours à l'utilisation de modèles animaux est indispensable dans notre étude. Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable (Réduire). Afin de limiter toutes sources d'angoisse et de souffrance la réalisation du modèle de lésion médullaire est effectuée sous anesthésie générale. Les animaux du modèle reçoivent de l'analgésique avant l'opération, puis 1 fois par jour pendant 3 jours, pour éviter toute souffrance. Les souris sont conservées dans des cages de taille suffisante, et avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le bien-être des souris est surveillé tout au long de l'étude tous les jours, avec un remplacement journalier de la litière et une mise en place d'un enrichissement par frisos, et en évaluant l'état général des animaux, et des points limites sont mis en place. En cas d'éventuels signes de souffrance les animaux sont euthanasiés (Raffiner).

6606. En dépit des progrès observés au cours des deux dernières décennies dans la prise en charge clinique des enfants souffrant de Leucémie Myéloïde Aiguë ou LMA, jusqu'à 30% des enfants et adolescents atteints continuent de mourir de cette maladie. La principale cause de ces décès est liée à la forte hétérogénéité observée dans ces cancers qui rend leur prise en charge particulièrement difficile.

L'objectif de ce projet est d'obtenir, pour la première fois, des modèles précliniques qui soient le plus représentatifs possible de la maladie.

Pour cela, le passage par l'animal est nécessaire afin de conserver le caractère hétérogène de la maladie. Actuellement, ceci ne peut être réalisé que sur souris immunodéficientes (NOD Scid Gamma).

Les modèles précliniques de la LMA existant ne sont pas adaptés à l'étude de nouvelles thérapies car ils ne récapitulent pas les caractéristiques de la maladie. Entre autre, les cellules leucémiques de patient implantées dans des modèles de souris immunodéficientes ne bénéficient pas des interactions spécifiques requises entre les cellules sanguines humaines et le micro environnement de la moelle osseuse (BM); plus important encore, toutes les leucémies de patients ne se développent pas chez ces souris et le potentiel de prise de greffe n'est pas identique pour tous les sous-clones constitutifs de la tumeur, ce qui affaiblit la représentativité clinique des modèles obtenus. Afin de surmonter les limitations mentionnées ci-dessus, les efforts se sont orientés vers le développement de structures tridimensionnelles implantables qui pourraient mimer le microenvironnement de la moelle osseuse humaine, où les cellules souches interagissent avec la matrice extracellulaire et les cellules de soutien.

Notre objectif est donc d'utiliser ce type de structures biomimétiques, associées à des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC), implantées chez la souris et reconstituant la structure de la moelle osseuse et favorisant la prise de greffe des cellules leucémiques.

Le support poreux choisi est appelé "collagraft" ou "collablock" et est formé de billes se composant de 60% d'hydroxyapatite et de 40% de phosphate tricalcique et de fibrilles de collagène qui sont capables de former une structure pseudo-osseuse *in vivo*.

Ceci nous permettra de disposer d'outils précliniques très représentatifs de la pathologie humaine contribuant à la réussite du traitement de la leucémie pédiatrique en fournissant une solide justification à l'utilisation de nouveaux composés thérapeutiques.

Les modèles expérimentaux seront générés en greffant sous la peau des structures tridimensionnelles contenant des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC). L'implantation de cellules tumorales de patients souffrant de LMA se fera par injection dans ces structures 3 à 9 semaines plus tard.

Le projet vise à apporter la preuve de concept expérimentale de la faisabilité d'une telle approche, aussi le nombre d'échantillons cliniques testés est limité à 10, et le nombre maximal d'animaux nécessaire pour cette étude est de 314. Cette étude permettra de disposer des premiers modèles représentatifs de LMA pédiatrique

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque souris sera porteuse de 4 structures tridimensionnelles, ce qui permettra d'utiliser 4 fois moins d'animaux que prévu.

Une fois les cellules leucémiques récupérées et congelées, les modèles de LMA ne seront plus maintenus sur souris que pour mettre en œuvre des études précliniques ultérieures.

Les animaux sont hébergés dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé. Les animaux sont maintenus en petits effectifs par cage. Les cages sont changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux reçoivent un enrichissement de milieu (Neslets). La souffrance des animaux dans le projet est limitée par l'injection d'une solution anesthésique au moment de la greffe des structures tridimensionnelles. Leur état physique et leur comportement sont contrôlés quotidiennement. En cas d'apparition de signes cliniques, les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse seront appliquées : ajout d'enrichissement supplémentaire (bâtons de bois, « Dome house ») en cas de bagarre, supplémentation de l'alimentation en gel nutritif en cas de perte de poids.

6607. L'hépatoblastome est une tumeur rare mais représente la tumeur maligne primitive du foie la plus fréquente chez l'enfant. 10 à 20% des patients présentent des métastases au diagnostic (hépatoblastome de très haut risque). Aujourd'hui encore, selon les séries, en dépit des progrès observés au cours des dernières décennies, 40 à 80% des enfants présentant des métastases au diagnostic continuent à mourir de cette maladie. Le traitement est défini actuellement en Europe selon un protocole qui associe une chimiothérapie à un traitement chirurgical. Il a été décrit précédemment chez certains patients ayant eu une hépatectomie partielle première sans chimiothérapie pré-opératoire, un développement précoce et rapide d'une récurrence locale tumorale et la survenue de

métastases entre le 10ème et le 15ème jour post-opératoire. Ce court intervalle de temps correspond à la période de régénération hépatocytaire maximale chez l'homme après une hépatectomie. L'objectif de cette étude est d'évaluer pour la première fois *in vivo* l'impact de la régénération hépatique après hépatectomie partielle sur la croissance tumorale d'un hépatoblastome à distance du foie chez la souris, modélisant la croissance des métastases chez les patients après hépatectomie partielle. Des souris nude greffées en sous cutané avec un hépatoblastome seront utilisées comme modèle animal. Il n'est pas possible actuellement de mimer *in vitro* la régénération hépatique c'est pourquoi le passage par l'animal est aujourd'hui nécessaire afin d'objectiver au mieux l'impact de l'hépatectomie partielle et la régénération hépatique qui s'en suit sur la croissance tumorale des hépatoblastomes.

Le projet vise à apporter la preuve de concept expérimentale de la faisabilité d'une telle approche, aussi le nombre de procédures expérimentales est limité à 2, et le nombre maximal d'animaux nécessaire pour ce programme est de 174.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les tumeurs portées par les souris contrôles utilisées lors de la procédure 1 seront greffées sur les souris servant dans la procédure 2, ce qui permettra d'utiliser 12 souris de moins que prévu.

Les souris étant des animaux sociables, une souris ne sera jamais seule dans une cage. Les animaux disposeront en outre d'éléments d'enrichissement de leur milieu (coton – bâton de bois).

6608. La maladie d'Alzheimer (MA) représente la première cause de démence en France. C'est une maladie neurodégénérative lente et progressive qui se caractérise par des troubles de la mémoire et du comportement. Bien que l'étiologie de la maladie demeure mal connue et qu'il n'existe à ce jour aucun traitement curatif, des dérégulations du métabolisme énergétique sont observées et ont été proposées pour participer au développement de la MA. L'objectif de notre projet est de déterminer si le senseur du métabolisme énergétique cellulaire représente un acteur clé dans le développement de la pathologie. Pour cela des animaux transgéniques reproduisant en partie les lésions et troubles cognitifs observés dans la MA seront utilisés et nous développerons un modèle animal présentant des perturbations de ce senseur énergétique afin de déterminer si il est associé à une apparition plus précoce ou à une forme plus sévère de la MA. Les capacités cognitives des animaux seront mesurées dans plusieurs paradigmes comportementaux. A la fin des études, ces mêmes animaux seront mis à mort pour réaliser des analyses histopathologiques cellulaires et biochimiques des tissus cérébraux. En règle générale, chaque groupe expérimental comporte 18 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 1292 souris est envisagée.

Notre projet sera mené en conformité avec les recommandations de la règle des 3R. Il répond ainsi au maximum aux exigences de remplacement, réduction et raffinement. Le projet a été conçu pour que le nombre minimum d'animaux nécessaire pour assurer la validité scientifique et statistique soit utilisé en accord avec des études antérieures. Les animaux seront anesthésiés pour les interventions chirurgicales et leur bien-être sera pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation du même animal est optimisée afin de réduire le nombre total d'animaux utilisés. Finalement, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance ou angoisse que pourrait ressentir les animaux et les points limites seront appliqués en cas de gêne ou de souffrance manifestée.

6609. Toute chirurgie abdominale expose à un risque de complication bien connu : l'adhérence post opératoire. La cavité abdominale est tapissée par un revêtement de cellules mésothéliales appelé péritoine. Deux de ses principales fonctions sont la filtration, comme l'illustre son utilisation pour les dialyses, et la lubrification qui autorise le glissement sans frottement des organes intra-péritonéaux entre eux.

Toute agression-comme la chirurgie- de ce péritoine entraîne une réparation qui ne restaure pas les fonctions sus-citées et provoque de la fibrose créant des bandes appelées adhérences entre les organes. Elles ont pour conséquence des douleurs chroniques, des infertilités, des occlusions digestives. La durée d'hospitalisation augmente, les séjours hospitaliers se multiplient ainsi que les reprises opératoires. Il s'agit d'un réel problème de santé publique.

Devant ces situations difficiles quotidiennes, peu de ressources thérapeutiques efficaces existent actuellement. Les traitements visant à lutter contre l'inflammation, la fibrinogénèse, l'angiogénèse et ceux favorisant la fibrinolyse sont peu efficaces. D'autres substituts dérivés de tissus humains ou animaux ou de synthèse sont commercialisés. Ils agissent comme des barrières isolant la zone disséquée le temps de la cicatrisation. La prévention des adhérences est là aussi peu satisfaisante. La littérature récente s'accorde à dire que l'utilisation des cellules autologues pour créer par thérapie cellulaire un substitut de péritoine redonnant les fonctions du péritoine initial serait la piste la plus prometteuse pour réparer en post opératoires les zones à risque et prévenir ainsi les adhérences.

La présente demande d'autorisation de procédures expérimentales s'intègre dans un travail de mise au point d'un substitut de péritoine chez le rat dans un modèle d'adhérences post opératoires qui reproduit ce que l'on observe chez l'humain. Aucune méthode non-animale ne peut être utilisée en remplacement de ce modèle à ce jour. Au total 50 rats mâles Sprague-Dawley de 350 g âgés de 8 semaines seront nécessaires pour atteindre les objectifs de notre projet. Nous serons attentifs au suivi du bien-être animal dans les procédures expérimentales et utiliserons des moyens antalgiques appropriés si nécessaire.

6610. L'amyotrophie spinale est une maladie neurodégénérative caractérisée par la dégénérescence des neurones moteurs de la moelle épinière et du tronc cérébral entraînant une faiblesse et une hypotonie généralisée des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 naissance sur 10000, n'a aucun traitement et est la première cause de mortalité infantile liée à une maladie génétique. Elle est due à des mutations dans le gène SMN1 qui code pour une protéine de survie du motoneurone, la SMN. Il existe 5 formes cliniques de la maladie selon le degré de sévérité (amyotrophie spinale de type 0, I à IV, de la plus grave à la moins sévère). Le

modèle murin le plus utilisé (SMNdelta7) reproduit la forme sévère de la maladie (type I), mais sa mortalité précoce limite certaines études précliniques.

L'objectif de notre projet est de développer et caractériser un nouveau modèle murin d'amyotrophie spinale moins sévère, ce qui nous permettra d'envisager l'étude de nouvelles approches thérapeutiques aussi pour d'autres formes de la pathologie avec un début des symptômes plus tardive (type II et/ou III).

Afin de prendre en compte le bien-être des animaux, nous avons conçu les procédures expérimentales en respectant les règles des 3R :

Remplacement : il n'existe pas de moyen de remplacer l'utilisation d'animaux pour ces travaux car la maladie touche plusieurs tissus et structures tissulaires, tels que la jonction neuromusculaire.

Réduction : afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par groupe, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes).

Raffinement : les souris malades présentant un défaut de motricité recevront un aliment spécifique hydratant et nourrissant qui sera placé au sol dans la cage afin de leur en faciliter l'accès.

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 280 souris.

6611. Le diabète de type 2 est un désordre métabolique caractérisé par des hyperglycémies résultant d'un manque d'insuline, de son défaut d'action ou d'une augmentation de la gluconéogenèse.

Les gliflozines sont des molécules agissant comme inhibiteur du transporteur au glucose (SGTL2 pour Sodium Glucose Transporter 2). Cet antidiurétique agit par élimination du glucose sanguin par le rein conduisant à une glycosurie (glucose dans les urines). Cependant, chez le patient diabétique, cette diminution du glucose sanguin induite par la molécule est contrée par une augmentation de production de glucose endogène.

Le transporteur SGTL2 est exprimé dans les cellules alpha pancréatiques (glucagon). Son inhibition conduit à une sécrétion de glucagon (hyperglycémiant) montrant un étroit lien entre SGTL2 et glucagon, laissant entrevoir des perspectives thérapeutiques intéressantes.

Aussi, le Glucose Like Peptide 1 (GLP1) et ses analogues (Exendine 4 ou inhibiteur de la DPP4) sont des molécules inhibant la sécrétion de glucagon dans les cellules alpha pancréatiques.

Notre objectif serait d'évaluer l'effet d'un traitement conjoint associant Gliflozine et GLP1 qui pourrait permettre de prévenir l'hypersecretion de glucagon par le pancréas, et réduire la gluconéogenèse hépatique en utilisant le modèle murin.

L'objectif général du projet est de prouver, à travers plusieurs modèles complémentaires, l'évidence que la combinaison des gliflozines et des analogues du GLP1 prévient l'hypersecretion de glucagon par le pancréas, et réduit la gluconéogenèse hépatique.

Pour arriver à ce but, nous les administrerons aux souris (gavage/injection intrapéritonéale) afin de vérifier l'effet sur la glycémie et la sécrétion des hormones pancréatiques par prélèvements sanguins de faible volume.

Pour ce travail nous aurons besoin d'utiliser 280 souris, que le travail *in vitro* (culture cellulaire) ne peut remplacer.

Bien sûr, afin de veiller au bien-être de l'animal, toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé aux techniques et à l'éthique animale. De plus, Les animaux seront stabulés dans un environnement favorable à leur bien-être (cycle jour/nuit 12h/12h ; nourriture et eau ad libitum ; enrichissement de la cage avec tunnel et nid de cellulose).

Ils seront manipulés (prise de sang, chirurgie) dans une pièce dédiée et séparée de la salle d'hébergement.

6612. La Sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie dévastatrice avec une médiane d'espérance de vie proche de 3 ans pour laquelle aucun traitement ne permette de ralentir efficacement son évolution. La SLA est notamment caractérisée par la présence d'altérations mitochondriales sévères et une élévation des taux de fer au niveau des neurones moteurs. Ces observations ont amené à considérer l'accumulation régionale de fer comme une cible thérapeutique dans la SLA. La déféripone est un chélateur de fer sélectif et efficace dont l'innocuité a déjà été démontrée chez des souris et chez des patients parkinsoniens.

Le présent projet vise à évaluer les effets bénéfiques de ce chélateur de fer dans une lignée de souris transgénique SODm1, modèle d'étude de la SLA. Des expériences de caractérisation de ce modèle concernant l'accumulation de fer et le comportement moteur de la lignée seront d'abord réalisées. Puis l'effet de la déféripone sera testé à 2 doses sur les différents paramètres identifiés comme marqueurs de l'évolution de la maladie : poids corporel, comportement moteur, imagerie du système nerveux central, marqueurs tissulaires de la maladie et de l'accumulation de Fer. Les expérimentations seront réalisées selon les recommandations décrites par Ludolf (2007 et 2010) et Cathleen Lutz (Jackson laboratories) pour les études précliniques, notifiant les paramètres indispensables à étudier dans les modèles de SLA et les critères d'évaluation d'une étude pharmacologique dans ces modèles transgéniques.

Les études *in vivo* ne peuvent être remplacées dans ce travail. Le protocole sera réalisé sur 840 souris, nombre d'animaux minimal au regard des objectifs, en étudiant l'animal de manière longitudinale d'une part, et en étudiant plusieurs paramètres sur les mêmes animaux quand cela est possible. Aucune mesure d'analgésie ne sera envisagée au décours de la pathologie car elle pourrait altérer l'effet du chélateur et le décours de la pathologie elle-même. Les animaux seront suivis quotidiennement et tout animal présentant des signes de point limite, en dehors des symptômes classiques de la maladie, sera euthanasié.

Les effets attendus du traitement sont :

- 1) l'allongement de la durée de vie du modèle SODm1 en limitant les effets toxiques associés à l'accumulation de fer dans les neurones
- 2) un retard et/ou une diminution des manifestations cliniques (capacités motrices) et des marqueurs physiopathologiques de la maladie (neurones de la moelle épinière, accumulation de Fer)

Le chélateur de fer ayant déjà été utilisé chez l'homme pour d'autres indications, cette étude préclinique pourrait déboucher sur une étude clinique.

6613. Afin d'étudier le métabolisme du glucose et des lipides et les physiopathologies associées telles que le diabète et l'obésité, nous utilisons des modèles de souris dont certains gènes sont délétés ou réintroduits. Afin de comprendre la physiopathologie du diabète et de l'obésité, le modèle souris est le mieux adapté car il permet une analyse intégrée de maladies à phénotype complexe et multi-tissulaire, qui ne peuvent être reproduits dans des modèles non-animaux. Dans ce projet le nombre d'animaux utilisé est de 800 souris sur 5 ans, minimum nécessaire à l'obtention de résultats tangibles. En physiologie, la règle des 3R est complexe à mettre en œuvre. Cependant, nous essayons de réduire le nombre d'animaux en gérant de manière optimale les croisements pour obtenir le nombre d'animaux escomptés, raffiner en adaptant plusieurs protocoles non invasifs aux mêmes lots de souris, et remplacer en travaillant sur des lignées cellulaires lorsque l'expérimentation animale n'est pas nécessaire, ce qui n'est pas le cas pour ce projet.

6614. Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Dans ce projet, nous nous intéresserons à l'apparition de la phonophobie lors des crises de migraine et voulons étudier les interactions entre le premier relais du système nerveux central, situé dans le tronc cérébral, qui intègre les informations douloureuses venant de la face et des méninges, et les différents noyaux des voies auditives situés dans le tronc cérébral et le cortex. Pour réaliser cette étude, nous avons mis au point un modèle animal chez le rat qui consiste à injecter de manière répétée des substances inflammatoires (SI) à la surface des méninges et qui rend compte des différents symptômes observés lors des crises migraineuses. Nous effectuerons ensuite une analyse de l'effet de ces injections répétées -1 injection vs 4 injections (SI, 1x tous les 2 jours pendant 8 jours) comparées à celles de fluide cérébro-spinal artificiel (aCSF, témoin). A ces stimulations méningées, nous ajouterons ou non une stimulation auditive chez l'animal anesthésié avant d'étudier l'expression de la protéine Fos, qui reflète l'activation et la sensibilisation des neurones, dans les noyaux des voies auditives. Ainsi nous aurons 6 groupes d'animaux (6 animaux/groupe): 1 injection de SI avec son, 1 injection de SI sans son, 4 injections de SI avec son, 4 injections de SI sans son, aCSF sans son, aCSF avec son.

Pour respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but, les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habituation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux chez qui il serait impossible de réaliser ces tests. Ce nombre tient également 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). Au total 36 rats seront utilisés dans ce projet. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

Ces données expérimentales seront un prérequis pour entrevoir les possibles mécanismes physio-pathologiques sous-jacents aux modifications sensorielles observées chez les patients migraineux.

6615. La douleur aigue est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles à ce jour ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il est donc indispensable de découvrir de nouveaux médicaments anti-douleur.

Au cours de ces dernières années, notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur s'est considérablement améliorée. Pourtant, cela n'a débouché sur aucune avancée thérapeutique majeure. L'une des raisons à cet échec est qu'il n'existe pas une mais des douleurs. En effet, qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes spécifiques. Aussi, un médicament efficace sur l'un, la douleur spontanée par exemple, ne le sera pas nécessairement sur un autre, l'allodynie mécanique par exemple, et inversement. D'où la nécessité de mettre au point des traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes.

L'allodynie mécanique est le symptôme le plus fréquemment rencontré chez les patients douloureux chroniques : chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. En particulier, l'apparition d'une allodynie chez un migraineux est un facteur de risque de chronicisation. D'où l'intérêt de traiter ce symptôme. Or on sait maintenant que l'apparition d'une allodynie mécanique est associée à l'activation, dans la corne dorsale de la moelle épinière ou le sous-noyau caudal du trijumeau (Sp5C), d'un circuit neuronal où des interneurons exprimant une isoforme particulière de la protéine kinase C, l'isoforme  $\gamma$  (PKC $\gamma$ ), jouent un rôle clé. L'inactivation, génétique ou pharmacologique, de la PKC $\gamma$  prévient l'apparition d'une allodynie mécanique alors que son activation, au contraire, la provoque. Inhiber la PKC $\gamma$  semble donc être un moyen efficace de traiter l'allodynie mécanique.

Nous avons établi une collaboration pour concevoir et synthétiser des inhibiteurs spécifiques de la PKC $\gamma$ . Il s'agit dans le présent projet d'évaluer l'effet d'un premier inhibiteur sur un modèle d'allodynie mécanique de la face chez le rat (injection intradermique d'adjuvant complet de Freund). Dans ces premiers tests, nous évaluerons le potentiel à la fois préventif (sur l'apparition de

l'allodynie) et curatif (sur allodynie une fois installée) d'une seule concentration relativement importante ( $\times 100$  IC50) de cet inhibiteur.

En vue de l'application de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés pour ce projet a été réduit au maximum. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non paramétrique). Au total 50 rats seront utilisés. Ils seront mis à mort après la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

Toutes les injections – sous-cutanées ou intracisternales – seront faites sous anesthésie. Cependant, il n'est pas possible de réduire la douleur infligée par l'injection d'adjuvant complet de Freund dans la lèvre supérieure puisqu'il s'agit justement du comportement que nous désirons mesurer. Par contre tout sera fait pour réduire au maximum l'anxiété provoquée chez les animaux par le nouvel environnement – animaux hébergés dans des cages à environnement enrichi dans notre animalerie pendant une semaine avant toute manipulation – et à l'expérimentateur – les animaux soumis à des séances d'habituation pendant 4 jours avant l'expérience

6616. L'électrocardiogramme (ECG) est une mesure peu coûteuse et non invasive de l'activité électrique cardiaque sur le thorax. Mais le diagnostic par ECG est limité et on lui préfère, pour un diagnostic précis, des mesures par des cathéters placés en contact direct avec la paroi cardiaque. Malheureusement, ce dispositif est invasif et ne donne qu'une vision locale de l'influx électrique. Depuis peu, grâce à l'augmentation des puissances de calcul, on peut mettre en œuvre une idée ancienne qui consiste à reconstruire mathématiquement les potentiels tels qu'ils seraient mesurés par des cathéters, mais à partir d'ECG thoraciques et d'imagerie structurelle.

Néanmoins, cette technique se heurte à une difficulté conceptuelle importante : la nécessité de résoudre un problème inverse qui est connu pour être mal posé. Par opposition au problème direct qui consiste à calculer en surface du torse les signaux créés par une source telle que le cœur, le problème inverse cherche les potentiels du cœur à partir de ceux mesurés sur le torse et il existe une infinité de solution pour une même trace électrique sur le torse. Le choix d'une solution physiologiquement vraisemblable est donc intégré comme une contrainte mathématique dans la résolution du problème inverse.

Bien que de très bonne qualité pour ces mécanismes simples, la solution courante du problème inverse montre ses limites en particulier lors d'activités à faible amplitude telles que couramment observées dans certaines pathologies (Fibrillation auriculaire, ischémie, ...). Ainsi, le calcul de marqueurs indispensables à la compréhension et la thérapie de nombreuses pathologies électriques cardiaques ne sont pas envisageables sans l'amélioration de la solution du problème inverse.

L'objectif de notre projet de recherche est d'améliorer significativement l'outil de reconstruction des potentiels électriques.

A cette fin nous disposons d'un torse artificiel disposant de 256 électrodes permettant une mesure des potentiels tels qu'ils sont mesurés par des électrodes de surfaces. Le torse est prévu pour accueillir un cœur de taille et de morphologie proche d'un cœur humain à un emplacement anatomiquement correct. L'électricité émise par l'activité cardiaque peut ainsi être enregistrée par le système.

Pour cette étude, les animaux seront prémédiqués, maintenus sous anesthésie générale, les cœurs seront alors arrêter grâce à l'utilisation d'un protocole clinique standard pour transplantations cardiaques puis prélevés pour une étude *ex vivo* et *in vitro* dans le torse artificiel.

Les cœurs seront maintenus en activité par une perfusion de type Langerdoff et placé dans le torse. Les activités électriques seront mesurées simultanément par les électrodes de surface du torse et 64 électrodes directement en contact avec la surface des cœurs.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons tout d'abord travaillé sur des modèles mathématiques du cœur et de la propagation des signaux électriques jusqu'au torse (*in silico*). Néanmoins l'étude *in vivo* est maintenant indispensable à la poursuite du projet afin de valider les méthodes développées et créer une base de données pour le développement et la validation des algorithmes à venir. Le nombre total d'animaux envisagé pour les 5 prochaines années est de 100 porcs. Ceci permettra l'étude de quatre pathologies cardiaques humaines et une application à l'homme dans les prochaines années. Les animaux inclus dans le projet sont des animaux de rente, élevés selon les normes en vigueur au sein d'exploitations dédiées. Afin de supprimer l'inconfort et de respecter le bien-être des animaux toutes les mesures nécessaires seront mises en place, de leur prise en charge jusqu'à la fin du projet.

6617. Améliorer la durabilité des systèmes d'élevage tout en préservant la compétitivité des filières est un enjeu majeur. Dans ce contexte, réduire l'usage des xénobiotiques (antibiotiques notamment) tout en préservant la santé des animaux est un objectif bien identifié, qui participe à l'ambition partagée par le concept de « One Health » ou « santé globale », continuum d'intérêt entre santé animale et santé humaine : de la santé des uns dépend la santé des autres. L'un des leviers d'intervention en élevage qui répond à ces objectifs de durabilité et de respect de l'environnement est l'amélioration de la vaccination contre des agents pathogènes endémiques responsables de pertes économiques importantes.

Notre projet vise l'espèce porcine, race Large White. Il a pour objectif d'étudier la variabilité individuelle de réponse à la vaccination contre deux pathogènes endémiques en élevage, la bactérie *Mycoplasma hyopneumoniae* et le virus de la grippe porcine Influenza A, et de rechercher des informations qui peuvent prédire les variations de réponses (marqueurs génétiques, biomarqueurs sanguins, biomarqueurs microbiens présents dans le microbiote intestinal). La découverte de tels marqueurs et leur utilisation permettra d'améliorer l'efficacité de la vaccination en élevage.

550 animaux au total seront utilisés dans ce protocole : 50 truies et 500 porcelets. Avant vaccination, nous effectuerons des prélèvements de sang et de fèces sur les porcelets afin de caractériser les polymorphismes du génome, les gènes exprimés dans le sang et le microbiote des porcelets. Parmi ces informations, nous rechercherons des marqueurs qui peuvent prédire la capacité des porcelets à répondre à la vaccination. Après vaccination, nous suivrons la réponse individuelle à la vaccination par des prélèvements



de sang dans lesquels nous pourrions mesurer la production d'anticorps spécifiques. Pour les animaux vaccinés contre le virus de la grippe porcine, l'efficacité de la vaccination sera également évaluée par des tests cellulaires *in vitro*. Des échantillons de fèces seront prélevés après vaccination pour analyser la dynamique de changement du microbiote intestinal et les liens éventuels avec les variations de réponse aux vaccins.

Pour ce protocole d'expérimentation, nous avons pris en compte la règle des « 3 R » :

- Remplacement : Les animaux produits dans un cadre de production animale en élevage conventionnel ; ils seront engraisés et commercialisés. La réponse vaccinale sera testée *in vitro* ce qui évite une infection *in vivo* des animaux
- Réduction : Pour ce projet, nous allons produire 50 familles de porcelets. Par portée, 4 animaux seront vaccinés avec un vaccin, 4 animaux seront vaccinés avec un deuxième vaccin, et 1 à 2 porcelets ne seront pas vaccinés. 200 porcs seront donc vaccinés avec chacun des vaccins et 50 à 100 porcs, non vaccinés, constitueront un groupe contrôle partagé entre les deux protocoles de vaccination. Ce nombre d'animaux a été déterminé par des expériences précédentes et constitue le nombre minimal d'individus pour une approche de génétique. Vacciner des porcelets d'une même portée pour les deux vaccins permet d'optimiser la production des familles, et de proposer un dispositif familial avec quatre descendants issus de 50 familles indépendantes, situation plus favorable pour des analyses génétiques que des dispositifs de huit porcelets issus de 25 familles. Ce dispositif permet de plus de partager le groupe témoin non vacciné. .
- Raffinement : Les échantillons prélevés seront analysés avec des approches omiques qui génèrent des quantités très importantes d'informations biologiques. Ces approches permettent de maximiser la quantité de données produites par échantillon.

6618. Notre projet s'intéresse au développement des plaques d'athérosclérose dans les vaisseaux, qui sont responsables des maladies vasculaires. Nous étudions plus précisément le rôle des agents de stress proinflammatoires en particulier via la production de radicaux libres oxygénés dans les cellules. Nos travaux sont basés sur des études *in vitro* sur cellules vasculaires en culture (cellules musculaires lisses, fibroblastes et cellules endothéliales), portant sur la prolifération, la mort et la migration cellulaire sous l'effet des agents de stress, et sur l'effet protecteur d'agents pharmacologiques antioxydants et/ou inhibiteurs des réponses proinflammatoires. Les objectifs de notre projet sont de caractériser leur mécanisme d'action dans le but de :

1/ Proposer de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques pour prévenir et traiter les pathologies vasculaires

2/ Identifier de nouveaux marqueurs associés au développement de ces pathologies.

Ces objectifs nécessitent l'utilisation de modèles animaux (en particulier murin) qui permettent de valider les résultats observés sur cellules en culture. Chaque projet nécessite l'utilisation de modèles appropriés, soit sous forme d'animal génétiquement modifié (dont la mutation invalide les voies de signalisation d'intérêt) soit des animaux traités par des inhibiteurs pharmacologiques. L'intérêt de la démarche expérimentale sur animal, est de valider les différentes hypothèses sur un modèle complexe, et ce, de manière efficace et pertinente. Les inconvénients de cette pratique pourraient résider dans une utilisation non réglementaire et non respectueuse des animaux, donc nous sommes particulièrement vigilants sur le développement de nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :  
Remplacement : Les expérimentations sur les animaux sont organisées dans le but de confirmer les résultats obtenus sur cellules. Cette démarche est indispensable pour la validation des hypothèses de travail. Les études sont systématiquement optimisées (doses inhibitrices, durée du régime) d'après la littérature ou les études précédemment réalisées au laboratoire. Dans la mesure du possible, les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (par priorité : alimentation ou boisson/injection IP/ injection IV)

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, les expériences sont planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter de programmer des séries inutiles. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (volume à injecter, durée du traitement...). Pour chaque expérience et en fin de protocole, le maximum d'échantillons est extrait de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel.

Raffinement : L'application de la politique de réduction mise en place permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animaux un maximum d'informations. Selon l'annexe 1 de l'arrêté du 1er février 2013, les procédures expérimentales sont de classe de gravité légère sauf pour une procédure qui est de classe sévère. L'inconfort et la douleur seront évalués par l'analyse des symptômes principaux de douleurs, de maux ou de dommages. Ainsi une attention particulière est portée à une réaction de défense intensifiée, à une tendance à mordre, au dos voûté, à la déshydratation et à l'amaigrissement. Par ailleurs, des symptômes individuels tels que le comportement social (retrait du groupe, réaction aux stimuli extérieurs) ou l'activité de la souris (mutilation, prise de nourriture et d'eau, rythme du sommeil) seront également surveillés chaque jour. Il est prévu d'utiliser 475 animaux dans ce projet. De plus la formation des personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir dans des conditions appropriées (temps de formation respecté) permet de réaliser nos expérimentations dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité.

6619. Tip60 est une lysine acétyltransférase. Tip60 est aussi impliqué dans la modulation de la réponse aux dommages de l'ADN et dans l'acétylation des histones comme H2A (K5), H3(K14), et H4 (K5, K8, K12 et K16). Une analyse immunohistochimique a démontré une diminution de l'expression nucléaire de Tip60 dans les cancers du sein. Cette perte d'expression est corrélée au grade de la tumeur. Tip60 aurait un rôle de suppresseur de tumeur dans le cancer du sein. L'étude de l'implication de Tip60 dans le cancer du sein est donc nécessaire afin de déterminer les conséquences de la perte d'expression de cette protéine. De ce fait, nous souhaitons évaluer les effets de la perte d'expression de Tip60 et étudier la progression tumorale. Ce projet comportera donc des tests sur des souris immunodéprimées après injection de lignées tumorales représentant différents sous-types moléculaires du cancer du sein. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation

animale. Des cellules de cancer du sein modifiées pour exprimer de la bioluminescence seront utilisées pour permettre un suivi de l'évolution tumorale *in vivo* en imagerie optique sans sacrifier les animaux. La procédure expérimentale induit peu de douleur, afin de surveiller les souris elles seront observées et pesées régulièrement. Cette étude permettra d'éclaircir l'implication de Tip60 dans le développement du cancer du sein. Le nombre d'animaux nécessaire est de 130 souris pour la durée du projet.

6620. La production de neurones, ou neurogenèse, ne s'arrête pas brutalement à la naissance mais persiste dans des régions spécifiques du cerveau antérieur des mammifères comme le bulbe olfactif. A la naissance, ces nouveaux neurones sont générés par des cellules souches qui résident dans des régions périventriculaires. Ces cellules souches sont une source potentielle de cellules pour régénérer le cerveau antérieur postnatal après lésion, sous réserve d'une bonne connaissance de leurs caractéristiques, notamment en termes de potentiel neurogénique, phénotype et localisation anatomique.

De premières caractérisations ont pu mettre en évidence une hétérogénéité régionale des progéniteurs dans la zone sous ventriculaire, une sous population exprimant le facteur de transcription Neurogenin2 (Ngn2). Ce projet a pour but d'analyser la spécification des cellules issues de ces progéniteurs ainsi que leur intégration anatomique.

Nous estimons qu'un nombre total de 36 souris transgéniques seront nécessaires pour accomplir ce projet. Tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que leur stress ou souffrance. Cela sera assuré par l'optimisation du nombre d'animaux par condition expérimentale, ainsi qu'une optimisation du design expérimental, comme détaillé dans le formulaire.

6621. La mutation du gène oligophréline est associée chez l'homme à des déficiences intellectuelles. Notre objectif est de comprendre les mécanismes cellulaires – plus particulièrement neuronaux – qui entraînent cette perte de capacité. Nous voulons donc observer et manipuler l'activité neuronale chez la souris sauvage ou porteuse d'une mutation du gène oligophréline lorsque l'animal est en train d'effectuer une tâche comportementale. Nous utilisons des techniques d'enregistrements électro-physiologiques *in vivo* et de pharmacologie afin d'établir des liens de causalité entre les déficits comportementaux et cellulaires observés chez ces animaux. Notre objectif à terme est de comprendre comment la perte de fonction d'une protéine synaptique unique entraîne des désordres comportementaux, et ainsi de mieux connaître les mécanismes permettant au cerveau d'adapter notre comportement aux pressions environnementales. Ce projet utilisera 62 souris. Dans le souci du respect de la règle des 3R, ce nombre est choisi pour obtenir des statistiques solides au cours des tests comportementaux tout en tenant compte des contraintes expérimentales liées à la manipulation longue des animaux. Pour les protocoles de chirurgie générant de la douleur, une médication adaptée sera utilisée pour la soulager. Les animaux expérimentés feront l'objet d'un suivi spécifique et adapté.

6622. Les études règlementaires de tolérance locale et générale sont requises par la loi. Elles respectent la réglementation relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la réglementation relative aux médicaments vétérinaires et les lignes directrices en vigueur.

Les études règlementaires de tolérance locale et générale ont pour objectif de fournir des informations sur la sécurité des produits pharmaceutiques vétérinaires testés sur l'espèce cible selon les recommandations d'utilisation. Ces études sont indispensables pour l'autorisation de mise sur le marché des produits pharmaceutiques vétérinaires.

Elles permettent notamment d'identifier les effets potentiellement indésirables du produit.

Conformément à la ligne directrice en vigueur, les études règlementaires de tolérance locale et générale *in-vivo* sont nécessaires et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Grâce à une bonne standardisation des essais, le nombre d'animaux est réduit à son minimum tout en évitant de compromettre les objectifs des études.

Ainsi, un maximum de :

- 250 bovins,
- 250 porcins
- 250 ovins,
- 100 caprins,
- 50 équins
- 250 volailles (poules, dindes, canards)
- 250 lapins

Pourra être inclut dans les études sur une durée de 5 ans.

Pour chacune des espèces, le nombre d'animaux est soigneusement évalué à l'aide de la ligne directrice en vigueur, des informations disponibles sur la molécule, de la bibliographie, et des analyses statistiques prévues. Dans tous les cas, ce nombre doit permettre d'observer des différences entre les groupes de traitement.

L'Etablissement Utilisateur fournit des conditions d'hébergement adaptées. Les animaux bénéficieront d'un logement, d'un environnement, d'une alimentation, d'un apport en eau et en soins appropriés à leur santé et à leur bien-être. Un enrichissement sera mis à disposition des animaux dès que cela sera possible. Afin de maintenir des conditions optimales d'hébergement, les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement sont vérifiés quotidiennement.

Les animaux sont suivis quotidiennement au moment des observations quotidiennes et/ou d'examen cliniques, afin d'identifier rapidement toute douleur, souffrance et/ou angoisse. Lors de ces observations, si un animal montre des signes de pathologie, de

souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

6623. Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial des bactéries de la flore intestinale dans la régulation de la croissance tumorale et l'efficacité de traitements anti-cancéreux. En effet, ces résultats montrent que certaines bactéries de la flore intestinale augmentent l'activation de cellules immunitaires anti-tumorales permettant d'amplifier l'effet anti-tumoral de chimiothérapies et immunothérapies connues pour activer le système immunitaire, tels que le cyclophosphamide et l'anti-CTLA4.

Dans ce projet, nous évaluerons l'effet de chimiothérapies (Méthotrexate et Cyclophosphamide) combinées à de l'immunothérapie (anti-PDL1 et anti-4-1BB) sur l'immunité anti-tumorale et la progression tumorale chez des souris porteuses de tumeurs mammaires. Afin de déterminer le rôle de la flore intestinale, nous utiliserons des souris dépourvues de flore intestinale suite à un traitement par des antibiotiques. Ce projet permettra de concevoir des traitements anti-cancéreux combinant la chimiothérapie et l'immunothérapie mais également de déterminer le rôle de la flore intestinale dans l'amélioration de la réponse aux traitements.

Chez les patients atteints de cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale (dysbiose). Ainsi, la sensibilité ou la résistance de certains patients à des traitements anti-cancéreux pourraient s'expliquer par une différence dans la composition en bactérie de la flore intestinale. C'est pourquoi nous cherchons également à caractériser les dysbioses liées à la pathologie cancéreuse et en particulier lors de la carcinogenèse mammaire. Pour cela, nous collectons les fèces de patientes atteintes de cancer du sein après traitement par une chimiothérapie (Le suivi des patientes nous permet de déterminer les patientes répondeuses ou non au traitement). Puis nous réaliserons des expériences de transplantation fécale chez la souris porteuse de tumeurs mammaires afin d'établir un lien entre la composition en bactérie de la flore intestinale, l'immunité et la croissance tumorale. A terme, ce projet permettra de concevoir des suppléments en probiotiques permettant de modifier la composition en bactérie de la flore intestinale pour améliorer les réponses aux traitements et de sélectionner les patientes pouvant bénéficier de cette thérapie.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier l'immunité et l'effet d'une transplantation fécale dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*. Le projet nécessitera 2100 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons de traitements (chimiothérapie et immunothérapie), les différents modèles tumoraux mais également par le nombre de prélèvements fécaux.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de réduction et de raffinement. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (enrichissement, anesthésie, surveillance attentive). Des données scientifiques seront récupérées le plus possible de chaque animal pendant les procédures et au décours de celles-ci.

#### 6624. 1 - Objectif scientifique du projet :

Le déclin de la masse musculaire lié à l'âge, ou sarcopénie, est un phénomène progressif dont les conséquences sur la santé peuvent être désastreuses. En effet, les muscles squelettiques sont essentiels pour le maintien de la posture, la mise en mouvement du squelette, la respiration et la régulation du métabolisme. Chez un individu sain, les muscles squelettiques représentent environ 40 à 50 % de la masse corporelle et sont le plus grand consommateur d'éléments nutritifs. L'état du tissu musculaire est donc un facteur crucial tout au long de notre vie.

Au cours du vieillissement physiologique, les cellules souches du muscle (appelées aussi cellules satellites) qui permettent la régénération de nos muscles tout au long de notre vie, perdent progressivement leur capacité à proliférer et à générer de nouvelles fibres musculaires. Les mécanismes précis de ce processus dégénératif sont encore mal connus, mais nous savons que ces cellules présentent des défauts intrinsèques, ici d'ordre épigénétique. Ces défauts épigénétiques vont altérer l'expression des gènes dans la cellule et donc ses fonctions dans le processus de régénération.

Notre équipe s'intéresse alors à rétablir un programme génétique normal dans les cellules satellites chez les individus âgés, par un traitement avec une molécule capable d'inhiber un facteur responsable de l'altération des marques épigénétiques, de manière à retrouver un processus de régénération musculaire normal chez les individus âgés.

#### 2 - Retombées attendues

Ce projet vise d'abord à mieux comprendre le fonctionnement normal des cellules satellites musculaires et les « défauts » moléculaires qu'elles présentent lorsqu'elles ne peuvent assurer la régénération des fibres musculaires au cours du vieillissement naturel. Enfin, nous espérons tester l'efficacité d'un traitement qui vise à rétablir une régénération musculaire normale chez les individus âgés.

#### 3 - Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Plusieurs alternatives à l'expérimentation animale dont la culture cellulaire de cellules satellites ont été utilisées pour étudier les défauts de régénération du muscle au cours du vieillissement. Cependant, la difficulté de la culture *in vitro* de ces cellules primaires et la complexité des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la régénération des fibres musculaires requiert l'utilisation d'un modèle animal.

Au cours du dernier siècle, le modèle souris s'est développé et il est désormais un modèle de choix dans la recherche génétique sur les mammifères. Le choix du modèle de la souris est dû aux étroites similitudes génétiques et physiologiques avec les humains, et à

la facilité avec laquelle son génome peut être manipulé et analysé. La souris se révèle donc être un système modèle idéal pour étudier le rôle de nos gènes d'intérêt sur le plan physiologique et moléculaire.

Chaque animal sera observé quotidiennement et toutes les mesures possibles seront prises pour évaluer et limiter une éventuelle souffrance.

4 - Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Sur une période de 2 ans, nous prévoyons l'utilisation de 216 souris. Les expériences sont organisées sur des groupes de 6 animaux pour chaque point de cinétique et chaque condition expérimentale pour permettre une interprétation statistique fiable des résultats.

6625. La tuberculose représente encore aujourd'hui une menace importante pour la santé dans de nombreux pays du monde, et ce, malgré l'existence d'un traitement antibiotique et d'un vaccin. En 2014, 9,6 millions de personnes ont développé une tuberculose et 1,5 million en sont mortes. Seules 10% des personnes infectées par *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), l'agent infectieux responsable de la tuberculose, sont incapables de contenir l'infection et développent une tuberculose active. Dans la majorité des cas, les bacilles seront confinés à l'état dormant au sein d'une structure multicellulaire appelé granulome. Si cet état de latence peut perdurer des dizaines d'années, une réactivation est possible à tout moment, notamment en cas d'immunodépression. L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques et l'efficacité controversée du vaccin BCG à l'âge adulte justifient la recherche de nouveaux traitements.

Une des approches de notre laboratoire consiste à développer un produit thérapeutique qui cible la phase active de la maladie via l'activation de la réponse immunitaire innée. Pour cela, plusieurs cytokines essentielles à la réponse protectrice anti-mycobactérienne ont été sélectionnées. Elles sont exprimées par un vecteur viral non propagatif connu lui aussi pour sa capacité à activer les mécanismes de l'immunité innée. Des tests *in vitro* avec des cellules murines ont démontré que les cytokines exprimées par les vecteurs viraux étaient biologiquement actives.

Ainsi, ce nouveau projet a pour but d'étudier, chez la souris, l'impact de nos différents produits sur la réponse immunitaire contre *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) et *Mycobacterium avium* (M.avium), des souches modèles non pathogènes. Ces expériences nous permettront de montrer l'activité biologique de nos produits *in vivo* dans un contexte pulmonaire.

Bien que le modèle murin ne reflète pas complètement la réponse cellulaire et granulomateuse observée chez l'Homme, il reste une bonne alternative. En effet il permet d'évaluer la capacité des produits d'immunothérapie à induire une réponse immunitaire efficace contre les mycobactéries. La réponse immunitaire induite par l'immunisation est multicellulaire et clairement influencée par la structure de l'organe dans laquelle elle se développe, le poumon. Cette complexité implique que les approches *in vitro* ne peuvent être envisagées pour cette étude.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit au minimum sans compromettre les objectifs de ce dernier que ce soit en termes d'analyse statistique ou de qualité des observations. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum sa souffrance.

Ce projet inclura un maximum de 1200 souris.

6626. Les expériences décrites dans ce projet visent à la compréhension des mécanismes d'adaptation de la truite à des stress environnementaux, pour améliorer le bien-être animal dans le cadre d'une aquaculture durable. Le stress environnemental choisi dans ce projet est la température car le changement climatique (avec l'augmentation programmée des températures) est susceptible d'impacter de manière néfaste l'élevage des poissons d'eau froide. Plus précisément, ce projet se concentre sur la variabilité génétique des marques épigénétiques suite à un stress thermique précoce (durant le développement embryonnaire), et les conséquences sur les capacités d'adaptation des poissons en réponse à un stress tardif aigu de température.

Le matériel biologique sera constitué de 8 lignées isogéniques hétérozygotes de truite arc-en-ciel. Chaque lignée est issue du croisement par fécondation classique de deux parents totalement homozygotes. Dans une lignée, tous les individus possèdent le même génotype mais sont hétérozygotes. Ces lignées ont précédemment été caractérisées pour leur réponse à la température (4 « sensibles » et 4 « tolérantes » à un challenge thermique). Pour chaque lignée, la moitié des œufs sera incubée à température standard (11°C), l'autre moitié subira une manipulation thermique précoce (i.e. température d'incubation chaude 16°C, compatible avec un développement normal de l'embryon et de l'alevin). Un choc thermique aigu sera appliqué ultérieurement sur les alevins (5-10g) pour révéler l'effet de l'exposition précoce à des températures élevées sur la réponse au stress tardif (c'est cette partie du projet de recherche qui fait l'objet de la Demande d'Autorisation de Projet).

Notre projet s'inscrit dans une démarche compatible avec la règle des 3R. Nous avons recours à un matériel biologique original, les lignées isogéniques de truite-arc-en-ciel (animaux génétiquement identiques au sein de chaque lignée), ce qui nous permet de réduire le nombre de poissons analysés tout en gardant une puissance statistique forte pour détecter des différences significatives de réponse à un stress aigu de température (mesurée par les temps et cinétique de résistance à la température). De plus, nous mutualisons le matériel biologique autant que possible avec d'autres chercheurs. Nous prévoyons d'utiliser au total 6560 poissons sur une durée de 2 ans : 800 poissons (50 poissons x 2 températures x 2 réplicats x 4 lignées) en 2016 pour une expérience préliminaire et 5760 en 2017 (60 poissons x 2 regroupements par température x 2 températures x 3 réplicats x 8 lignées). En 2016, afin de vérifier la stabilité du classement des lignées d'une année sur l'autre et de consolider la pertinence du choix des lignées qui seront utilisées en 2017, une expérience préliminaire nécessitera 800 poissons : pour économiser les animaux, 4 lignées extrêmes (2 sensibles et 2 résistantes) seront testées lors de cette expérience préliminaire. En 2017, les regroupements de lots se feront comme suit : 3 bassins avec 60 poissons de chacune des 8 lignées incubée à température élevée (480 poissons par bassin) ; 3 bassins avec 60 poissons de chacune des 8 lignées incubée à température standard (480 poissons par bassin) ; 3 bassins avec 60 poissons de chacune des 4 lignées sensibles incubées à température élevée et 60 poissons de chacune des 4 lignées sensibles incubées à température standard (480 poissons par

bassin) ; 3 bassins avec 60 poissons de chacune des 4 lignées résistantes incubées à température élevée et 60 poissons de chacune des 4 lignées résistantes incubées à température standard (480 poissons par bassin). Pour chaque lignée et température d'incubation, il y aura donc 120 poissons répartis entre deux regroupements, d'où 60 poissons x 2 regroupements par température. Le nombre de 60 poissons par condition est calculé en fonction des coefficients de variation attendus de la mesure (temps et cinétique de résistance à la température) pour pouvoir avoir une puissance statistique classique. Le nombre de 8 lignées est nécessaire pour pouvoir mettre en évidence de manière significative la variabilité génétique (variation entre lignées) en réponse au stress aigu de température. Enfin, chaque test aigu sera répété 3 fois (3 bassins d'élevage) pour estimer si les paramètres mesurés (temps et cinétique de résistance) sont répétables et ainsi obtenir une puissance statistique suffisante lors des comparaisons entre lignées et condition.

Ce projet requiert une procédure expérimentale soumise à autorisation : la résistance à des stress aigus de température. La procédure proposée ne pourra être mise en œuvre qu'*in vivo* car aucun modèle *in vitro* n'existe pour caractériser les capacités d'adaptation des poissons en réponse à un stress de température. Cependant, chaque stress aigu de température est de courte durée (environ 6h). Pendant le stress, une surveillance du comportement des animaux est effectuée pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'anxiété subies. En effet, les poissons sont observés en permanence, et lorsque l'un d'entre eux perd l'équilibre plus de 5 secondes, il est retiré du bassin et replacé dans un bassin aux conditions de qualité d'eau normales pour récupération.

En fin d'expérimentation, les truites subiront une sédation puis seront euthanasiées avec une dose létale d'anesthésiant. Des tissus seront prélevés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à extraction de l'ADN. L'objectif sera de comparer les marques épigénétiques intra-lignée entre les deux conditions (température d'incubation standard versus chaude) et inter-lignées (entre lignées sensibles et entre lignées tolérantes ; mais également entre lignées sensibles versus tolérantes).

6627. L'objectif du projet est de produire un anticorps qui nous permettra de détecter de façon spécifique le gène Topaz1. Ce gène est hautement conservé chez les Vertébrés et spécifique des cellules germinales chez les mammifères. La délétion de ce gène chez un modèle rongeur (la souris) a été réalisée et, si la fertilité des femelles n'est pas perturbée, les souris mâles privées de Topaz1 sont stériles dues à un arrêt de la spermatogenèse lors de la première division méiotique. Le rôle exact de ce gène Topaz1 dans la méiose mâle n'est pas encore connu. Pour ceci, la détection de la protéine TOPAZ1 dans les gonades de la souris par utilisation d'un anticorps anti-TOPAZ1 est nécessaire. Tous les anticorps anti-TOPAZ1 d'origine commerciale existants ont été testés au laboratoire et aucun d'eux ne s'avère spécifique de la protéine TOPAZ1. Nous avons donc besoin de produire nous-même cet anticorps.

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

Lors des processus d'immunisation, la spécificité sera plus ou moins grande selon la nature de la partie de l'antigène qui générera l'anticorps et selon la réponse individuelle de l'animal en cours d'immunisation. C'est pourquoi, les procédés d'immunisation font appel à trois animaux pour assurer la réussite du protocole. La production d'anticorps contre TOPAZ1 de souris sera effectuée par cette méthode chez la chèvre. TOPAZ1 de souris (molécule "étrangère" pour la chèvre) sera injectée chez la chèvre âgée d'au moins six mois. Il est possible chez cette espèce et à cet âge de collecter le volume de sang (200 à 400 ml, selon le poids de l'animal) nécessaire au projet sans occasionner de stress ni altérer la santé de l'animal. Cinq injections de rappel seront effectuées à intervalle de trois semaines suivant la primo-injection pour augmenter l'efficacité de la production. Le sang sera collecté à la veine jugulaire une dizaine de jours environ après chaque injection d'immunisation. Les injections seront faites par voie sous cutanée ou intradermique en mélangeant l'antigène (la protéine TOAPZ1) avec un adjuvant afin d'améliorer la réponse immunitaire. A la fin du protocole d'immunisation et de prélèvements, dont la durée sera inférieure à un an, les animaux sont réintroduits dans le troupeau caprin du domaine. Pendant toute la durée de l'expérimentation, les chèvres seront maintenues dans les conditions usuelles de l'élevage caprin dans une structure d'expérimentation.

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

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

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

Réduction du nombre d'animaux : 3 animaux seront traités simultanément, considérant la variabilité de réponse d'un animal à l'autre, variabilité que l'on ne peut pas prédire. Réduire le nombre d'animaux risque de conduire l'expérimentation à l'échec.

6628. Différents anticorps thérapeutiques ont démontré leur efficacité clinique dans le traitement de plusieurs cancers tels que le mélanome ou encore le cancer de la prostate. Néanmoins, ces thérapies ont un coût important et ne sont efficaces que chez 15 à 30% des patients d'où la nécessité de trouver des marqueurs prédictifs de réponse mais également de nouvelles combinaisons thérapeutiques.

Nous savons que ces molécules permettent une réinduction de la réponse immunitaire qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses mais nous ignorons encore les voies cellulaires et moléculaires essentielles pour leur efficacité thérapeutique. Cette efficacité clinique est au prix de différentes toxicités secondaires pouvant être très graves. Par exemple, l'anticorps anti CTLA-4

induit des colites de haut grade chez 20 à 30% des patients nécessitant parfois l'interruption du traitement malgré une efficacité de ce dernier.

Dans cet objectif, nous souhaitons améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de ces anticorps thérapeutiques, d'accroître leur efficacité grâce à de nouvelles combinaisons avec un agoniste de TLR4 mais également par l'utilisation de peptide et de virus anti-tumoraux.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier l'immunité et l'effet d'une transplantation fécale dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*. Le projet nécessitera 2790 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques ainsi que les différentes voies de signalisation étudiées.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de réduction et raffinement. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux pour assurer la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (enrichissement, anesthésie, surveillance attentive). Aussi, les prélèvements sanguins importants seront effectués après anesthésie sous isoflurane. De plus, un maximum de données scientifiques sera récupéré de chaque animal pendant les procédures et au décours de celles-ci.

6629. Afin qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Ce projet fait suite à des observations lors d'une étude réalisée chez la lapine gestante. Le but de ce projet est d'investiguer les causes de ces observations et en particulier les variations de glycémie chez la lapine, envisagées comme cause possible.

Le recours à l'animal est nécessaire car la régulation complexe de la glycémie ne peut s'évaluer que sur l'animal vivant.

Pour cela, 6 lapines seront utilisées, ce nombre d'animaux correspondant au minimum afin de permettre l'interprétation des résultats. Ces animaux seront hébergés selon les standards en vigueur et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire.

Ils recevront par voie sous-cutanée 3 doses d'un produit à tester et 3 doses d'un produit de référence à intervalles de 2 ou 3 jours.

La glycémie sera mesurée en continu pendant plusieurs heures après chaque administration grâce à un implant de télémétrie, mis en place chirurgicalement. Le protocole d'antibiotique, d'analgésie et d'anesthésie a été validé par un vétérinaire.

Des mesures appropriées seront prises pour maintenir le bien-être des animaux.

6630. L'ostéogénèse imparfaite (OI), encore appelée maladies des os de verre, se caractérise par une fragilité osseuse excessive entraînant des fractures à répétitions. Cette maladie génétique présente une hétérogénéité clinique avec des formes plus ou moins sévères. Le traitement de l'OI par les bisphosphonates (inhibiteurs de la résorption osseuse) représente l'unique option thérapeutique pharmacologique mais ne donne pas entièrement satisfaction. Notre objectif est de proposer une alternative pour le traitement de l'OI, en réalisant une preuve de concept préclinique prouvant l'efficacité thérapeutique sur la formation osseuse d'inhibiteurs d'une enzyme intervenant dans l'agrégation plaquettaire. En effet, il a été montré récemment que cette enzyme était impliquée dans le remodelage osseux.

Nous évaluerons dans un modèle murin d'ostéogénèse imparfaite l'effet thérapeutique de ces molécules sur la densité et la microarchitecture du tissu osseux. Les marqueurs sériques et urinaires de la résorption/formation osseuse seront également dosés. De plus, les principaux organes de chaque animal seront prélevés et conservés en vue d'analyses complémentaires pour éviter une répétition de cette expérimentation. Afin de réduire le nombre d'animaux, des tests *in vitro* ont été réalisés au préalable afin de tester seulement les molécules les plus efficaces.

Au cours de cette étude, nous utiliserons 144 animaux obtenus par accouplement au sein de notre animalerie. Les molécules seront administrées quotidiennement par injection intra-péritonéale pendant deux mois à des animaux présentant la forme modérée ou sévère de la maladie. Les animaux seront observés quotidiennement pendant toute la période expérimentale afin de vérifier leur état clinique. Tout animal retrouvé en état de détresse ou montrant des signes de douleur sera susceptible d'être traité médicalement ou d'être euthanasié après décision du vétérinaire responsable.

Il s'agit ici d'un repositionnement de molécules déjà tombées dans le domaine public pour soigner d'autres pathologies en médecine humaine et qui ne présentent pas d'effets secondaires notoires.

L'effet de ces molécules, s'il est démontré, permettrait de proposer une alternative aux bisphosphonates et de palier aux limites de ce traitement pour l'OI. De plus, les applications de cette découverte pourraient couvrir l'ensemble des maladies associées à des fragilités osseuses comme l'ostéoporose.

6631. 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 leur cœur est de texture/élasticité différente du cœur normal. C'est pourquoi, il est impératif de trouver des moyens de caractériser un changement des paramètres mécaniques du cœur. Plusieurs techniques échographiques ne se sont pas réellement imposées en clinique, en raison de leurs complexités ou de leurs faibles fiabilités ou reproductibilités.

Le but de notre projet est de proposer une approche innovante permettant à l'aide d'un échographe ultrarapide de construire en temps réel la cartographie quantitative de l'élasticité et de la viscosité locale du cœur, ainsi que des flux de ses artères. On peut ainsi quantifier de manière précise les changements importants d'élasticité locale du cœur tout au long du cycle cardiaque, permettant

ainsi le diagnostic précoce des maladies cardio-vasculaires. Cette nouvelle technologie créée à partir des recherches issues de l'Institut Langevin est maintenant maîtrisée, et a permis la mise au point d'un prototype d'échographe ultrarapide.

Notre projet prévoit d'utiliser 20 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, et d'enregistrer les débits et mouvements viscoélastiques du cœur avec l'échographe ultrarapide.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet, qui vient à la suite d'essais effectués sur animaux sains, et l'échographe ultrarapide doit maintenant être testé dans différentes simulations d'anomalie cardiaque proche de la clinique humaine, afin de valider sa capacité à enregistrer et modéliser tous les débits et mouvements d'un cœur malade. Nous prévoyons d'utiliser le minimum d'animaux pour acquérir un maximum de données numériques. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance inutile, 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 l'expérimentation.

6632. Le moustique tigre *Aedes albopictus*, originaire d'Asie du sud-est, est l'une des espèces les plus invasives au monde. Cette espèce agressive pique préférentiellement les mammifères dont l'homme. Ce comportement alimentaire optimise la fécondité et la survie des femelles *A. albopictus* et augmente le risque de propagation de pathogènes zoonotiques, des animaux sauvages ou domestiques à l'homme. Pour protéger les animaux domestiques contre les arthropodes hématophages, on a recours à des produits insecticides.

Le Vectra 3D® est un médicament vétérinaire utilisé chez le chien pour le traitement et la prévention des infestations par les puces et les tiques et comme répulsif contre les phlébotomes (moucheron), les moustiques et les mouches d'étable. Dans une étude récente, nous avons montré l'effet répulsif puissant du Vectra 3D® contre *A. albopictus*. Etant donné que ce dernier a un tropisme vis-à-vis de l'homme et de l'animal, la question posée est la suivante : est-ce qu'un chien traité par le Vectra 3D® a un effet protecteur ou pas (voire négatif) pour l'homme ?

Pour répondre à cette question, nous allons réaliser une étude comparative dans laquelle trois groupes contenant des rats et des souris seront constitués (3 rats versus 3 souris/ groupe). Au total, nous aurons besoin de 18 animaux (9 rats et 9 souris). Tous les rats et les souris (N = 18) sont pesés puis anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une association de kétamine (100 mg/kg) et xylazine (10 mg/kg).

Pour le confort des animaux, un enrichissement sera mis en place à l'aide des dômes. Les animaux seront manipulés de façon à réduire au maximum le stress ; ils seront anesthésiés avant de les exposer aux piqûres de moustiques. Un gel oculaire pour la protection et l'humidification de l'œil sera appliqué à tous les animaux. Au moment du nourrissage des moustiques, toutes les fonctions vitales seront surveillées. Ainsi, l'expérimentation sera arrêtée pour tout animal présentant un des signes de souffrances prédéfinis.

6633. La maladie d'Alzheimer (MA) et la maladie (ou « démence ») à corps de Lewy (MCL) sont les deux principales pathologies cognitives neurodégénératives de la personne âgée et représentent respectivement 80 % et 20 % des patients déments. La MA, caractérisée par une apparition progressive de troubles mnésiques, est le résultat de l'action de deux mécanismes cérébraux : l'accumulation d'un peptide neurotoxique appelé peptide amyloïde- $\beta$ 42 s'agrégant pour former des plaques séniles, et un dysfonctionnement de la protéine Tau provoquant une dégénérescence progressive des axones. Parallèlement dans la MCL, on trouve dans le cerveau des patients des agrégats d'une autre protéine appelée synucléine, formant ce que l'on appelle des corps de Lewy caractéristiques de cette pathologie. Cependant, on retrouve aussi chez de nombreux patients MCL une quantité importante des marqueurs de la MA (plaques séniles et dégénérescence axonale). De plus, il a été montré que les performances aux tests cognitifs cliniques diminuent de manière identique au cours du temps pour les deux pathologies.

Ainsi, la distinction entre la MA et la MCL est très complexe d'un point de vue à la fois biologique et clinique. La mise en place d'un diagnostic précis et robuste est donc cruciale pour le traitement des patients, et celle-ci commence par des études précliniques comparatives sur des modèles animaux de ces pathologies.

Aujourd'hui, des études des réseaux cérébraux chez l'Homme et la souris démontrent le potentiel de l'IRM pour la discrimination de ces deux pathologies. De plus, une deuxième modalité d'imagerie du cerveau (Tomographie par émission de positons – TEP) qui utilise des traceurs radioactifs spécifiques, a déjà permis de mettre en évidence les plaques séniles dans des modèles murins de la MA. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle pas d'étude longitudinale comparative de modèles murins MA et MLC en utilisant les techniques mentionnées. Dans ce contexte, le but de ce projet est de caractériser et d'observer les différences entre ces pathologies en combinant les informations sur l'organisation cérébrale à la fois structurelle et fonctionnelle obtenues par IRM. De plus, nous allons corrélérer les résultats avec des informations obtenues par imagerie TEP du cerveau (cette partie de l'étude fera l'objet d'une demande d'autorisation séparée). Pour cela deux modèles de souris de la MA (THY-Tau22) et de la MCL (C57BL/6J-TG(Thy1-SNCA)12Mjff/j) seront étudiés, afin de mettre en évidence de potentiels marqueurs biologique permettant de distinguer l'évolution de ces pathologies. A noter qu'une telle étude nous permettra également d'établir et valider des outils robustes et fiables pour cartographier de manière non invasive la connectivité fonctionnelle et structurelle du cerveau de la souris. Ces outils pourront par la suite être utilisés pour d'autre projet.

Pour ce projet, une première procédure d'optimisation de l'anesthésie des animaux au cours de l'examen IRM sera nécessaire et formera un groupe de 5 souris. Au regard des données de la littérature et de la variabilité inter-individuelle, les 4 groupes expérimentaux seront eux constitués de 30 souris utilisées pour le suivi longitudinal de ces pathologies par imageries biomédicales et par étude du comportement. Ce projet comporte donc 3 procédures expérimentales, et le nombre d'animaux prévus est de 125.

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

- Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif du travail est de caractériser et différencier par le suivi longitudinal de deux maladies neurodégénératives ainsi que de détecter de nouveaux biomarqueurs *in vivo*. Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann et Whitney, adéquat pour les petits effectifs.

- Réduire : Nous n'utiliserons que 30 animaux par groupes expérimentaux, ceci étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité inter-individuelle. Ces mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les études comportementales et d'imageries. De plus, l'imagerie nous permettra de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure. Enfin, une fois la procédure IRM terminée, ces mêmes souris seront utilisées pour une partie des analyses histologiques.

- Raffiner : Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux. L'IRM étant un examen non invasif, aucun de ces animaux ne subira de test, d'opération ou d'administration de produit susceptible de provoquer de la douleur. Les animaux seront soumis à un contrôle quotidien au cours duquel une attention particulière est portée sur l'apparition de signes de détresses ou de changements de comportements majeurs tels qu'un changement dans la posture et la démarche de l'animal, la léthargie ou la réticence à se déplacer, les vocalises, l'agressivité, la présence de plaie(s), l'absence de toilettage, l'isolement, ou la perte de poids. La présence d'un ou plusieurs de ces signes pourra entraîner une euthanasie compassionnelle de l'animal. Cependant les conditions expérimentales non-invasives auxquelles sont exposés les animaux ne devraient impliquer qu'une apparition exceptionnelle de tels signes.

6634. L'Arthrite et l'Encéphalite Caprine (CAEV) est une maladie infectieuse virale qui affecte naturellement la chèvre. L'infection a été trouvée dans tous les troupeaux du monde mais à des fréquences et incidences beaucoup plus élevées dans tous les pays industrialisés jusqu'à atteindre 100% des troupeaux et des animaux du troupeau. Les pertes de lactation, la réforme anticipée des animaux malades et les entraves au commerce des reproducteurs entraînent de graves conséquences économiques pour les élevages. Le virus entraîne une encéphalite chez les animaux de moins de 4 mois et, chez les animaux plus âgés, des arthrites, des mammites et plus rarement, des pneumonies chroniques. Les arthrites atteignent surtout le carpe et se manifestent par l'apparition des « gros genoux ». Les mammites apparaissent sous deux formes : une forme aiguë ou « pis de bois » principalement chez les primipares et une forme chronique avec induration de la mamelle. Ces mammites ne modifient pas l'apparence du lait mais entraînent d'importants déficits de lactation. La forme encéphalique des chevreaux (avec paralysie progressive) et la forme respiratoire des adultes sont rarement observées en France. Le virus CAEV est un lentivirus spécifique des chèvres de la même famille que ceux du Maedi-Visna chez le mouton. Actuellement, aucun vaccin vétérinaire n'existe pour lutter contre ce pathogène.

L'objectif de ce projet est de tester un nouveau candidat vaccin contre le virus CAEV et d'en mesurer l'efficacité immunitaire protectrice. Pour cette étude durant douze mois, 18 chevrettes, espèce cible du virus, seront utilisées et réparties en deux lots, un lot non vacciné et un lot vacciné. La préparation ADN vaccinal ou le placebo sera injecté en dose unique validée préalablement. Un suivi sanguin sera régulièrement effectué pour examiner les réponses immunes humorales (dans le sérum) et cellulaires (cellules blanches du sang) sur une période de six mois. Afin d'évaluer l'efficacité du vaccin à 6 mois post-immunisation, les chevrettes contrôles et vaccinées seront infectés avec un virus CAEV isolat du terrain distinct du clone moléculaire infectieux utilisé pour la vaccination. Différents prélèvements seront poursuivis et réalisés afin d'évaluer les réponses immunes de la chevrete mais aussi la charge virale permettant ainsi d'évaluer l'immunité protectrice du candidat vaccin. Remplacement et réduction : en l'absence de méthode alternative pour mesurer l'efficacité vaccinale, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été déterminé grâce au plan d'expérience utilisé pour évaluer l'efficacité du vaccin. Raffinement : il y aura un enrichissement social (vie en groupe) et de structure (mise en place de ballon et de pierre de sel).

6635. L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, est la 3ème cause de mortalité et la 1ère cause de morbidité des pays industrialisés : 120 000 personnes en sont victimes chaque année en France, dont les 3/4 ont plus de 65 ans. Actuellement le rtPA (activateur tissulaire recombinant du plasminogène) et la thrombolyse mécanique par cathétérisme, qui permettent de lyser le caillot sanguin sont les deux seuls traitements des AVC. Ils ne sont efficaces que dans les 4 à 5 premières heures à partir de la survenue de l'AVC ce qui limite considérablement leur utilisation. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements.

L'occlusion du vaisseau cérébral va entraîner la mort irréversible par nécrose des tissus cérébraux en aval, formant le cœur de l'infarctus. Autour de ce cœur subsiste une zone dite de pénombre dans laquelle les cellules du tissu cérébral sont en souffrance mais ne sont pas encore mortes. Le volume final de lésion cérébrale correspondra au recrutement progressif du cœur de l'infarctus sur la zone de pénombre, avec mort cellulaire dans la zone de pénombre.

Une des stratégies thérapeutiques consiste à maintenir en vie les cellules de la zone de pénombre. L'absence de mise en place de la collatéralité (vasodilatation) majore l'hypo-perfusion cérébrale en particulier dans la zone de pénombre. La rupture de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) entraîne une perméabilité vasculaire anormale et la formation d'un œdème vasogénique ; ces deux phénomènes sont impliqués dans l'aggravation des lésions cérébrales et leur évitement pourrait diminuer le volume de lésion.

La sphingosine-1-Phosphate (S1P) est un lipide de signalisation qui possède un rôle majeur dans la biologie vasculaire. On sait que la S1P régule le flux sanguin et la perméabilité vasculaire ; elle est donc potentiellement impliquée dans la pathogenèse de l'AVC mais son rôle n'a jamais été étudié ni sur le cerveau « sain » ni dans les suites immédiates de l'occlusion artérielle. La S1P est délivrée par différentes sources cellulaires sanguines ; elle peut se fixer sur 3 récepteurs différents (dans le système cardiovasculaire), pour entraîner des réponses opposées : les récepteurs S1P1 produisent une vasodilatation/augmentation du flux sanguin et les récepteurs S1P2 et S1P3 entraînent une vasoconstriction/diminution du flux sanguin.



Les objectifs du projet sont

1) l'identification du rôle de la SIP en fonction de ses différentes sources cellulaires et de ses différents récepteurs dans l'AVC ischémique grâce à des modèles de souris déficientes pour les différentes sources ou pour les différents récepteurs. L'étude sera faite sur cerveau sain, puis après production d'un AVC expérimentale par thermo coagulation de l'artère cérébrale moyenne, par mesure du volume de l'infarctus cérébral, évaluation de la rupture de la BHE, évaluation de la mise en place de la collatéralité.

2) Si nous démontrons un rôle de la voie de signalisation de la SIP pour la protection cérébrale, nous pourrions tester l'effet potentiellement bénéfique des modulateurs des récepteurs de la SIP avec l'objectif de réduire l'extension de l'ischémie cérébrale chez des souris de type sauvage.

3) Comme l'hypertension artérielle est un facteur important d'aggravation des lésions ischémiques cérébrales chez l'homme (disparition de la fonction endothéliale) nous testerons aussi les effets des modulateurs des récepteurs de la SIP sur le développement de l'ischémie cérébrale sur des souris rendues hypertendues.

Plusieurs groupes de souris contrôles et transgéniques seront donc soumis à un AVC expérimental, le nombre d'animaux engagés par groupe (n=12 contrôles - 12 transgéniques) a été calculé pour obtenir la puissance statistique nécessaire. La méthode de prélèvement des cerveaux peut rendre incompatible son analyse par différentes procédures (histologie, marquage vasculaire, étude de la BHE), ceci implique la réalisation de plusieurs séries en parallèle.

Un soin particulier sera apporté au traitement contre la douleur avant et après les procédures chirurgicales et l'animal sera surveillé jusqu'à la fin de l'étude. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous-cutané) sera réalisée 30 minutes avant le début de la chirurgie et renouvelée /12h jusqu'à la fin du temps d'expérimentation. La souris est surveillée en couveuse puis remise en cage (5 souris par cage). Au cas où les douleurs persisteraient malgré les procédures entreprises, l'animal sera mis à mort.

Aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de la complexité des interactions entre la vascularisation cérébrale et le cerveau lui-même après ischémie cérébrale au cours du temps.

Ce projet nécessite 600 souris mâles pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans, ce nombre a été élaboré en accord avec la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

6636. Les cancers de la sphère urologique (rein, prostate, vessie) représentent 20% des cancers et pratiquement 15% des décès liés au cancer, ce qui équivaut à respectivement 1 300 000 cas et 500 000 décès par an dans le monde. Leur incidence est en progression constante de 1 à 10% suivant le type de cancer. Les cancers du rein et de la vessie sont réfractaires à toutes thérapies malgré, notamment en ce qui concerne le cancer du rein, le développement des thérapies ciblées. Concernant le cancer de la prostate, il se caractérise par des récurrences fréquentes, des métastases osseuses et également une résistance aux thérapies. Ces cancers sont donc des pathologies avec un très fort besoin pour lesquelles de nouvelles options thérapeutiques doivent être impérativement développées.

La réalisation d'études précliniques fiables nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines. Les tumeurs urologiques se caractérisent par une grande variabilité entre les individus et sont également hétérogènes au sein même de la tumeur. La validation préclinique d'un nouveau traitement passe donc par l'utilisation d'un large panel de modèles porteurs de tumeurs aux caractéristiques variables. Or, jusqu'à présent, les modèles d'étude se basent sur les lignées cancéreuses clonales en culture qui, d'une part, ne reflètent pas l'hétérogénéité de la tumeur et d'autre part, ne permettent pas de reproduire le microenvironnement tumoral. Ainsi, malgré le développement de cultures 3D dont la mise en œuvre reste difficile, les modèles animaux s'avèrent donc indispensables. Il n'existe pas de modèles animaux développant spontanément ce type de pathologies urologiques ni de modèles transgéniques récapitulant la cancérogenèse des cancers urologiques. L'approche par xénogreffe chez la souris immunodéficiente de tumeurs humaines (rein, vessie, prostate) directement obtenues à partir de patients au moment de la chirurgie apparaît comme le modèle d'étude le plus pertinent mais est encore très peu répandu dans la sphère urologique.

Aussi, dans le cadre de ce projet, nous nous proposons de développer de tels modèles précliniques afin de mettre sur pied une importante plateforme de modèles précliniques de cancers urologiques. A l'issue de ce projet, un grand nombre de modèles pourront être proposés permettant une évaluation fiable d'un candidat médicament ou d'une combinaison de molécules pour le traitement des cancers urologiques. L'établissement de tels modèles nécessite une collaboration étroite avec un service hospitalier de chirurgie urologique. De plus, ils sont techniquement difficiles à mettre en œuvre.

D'un point de vue pratique, chaque prélèvement tumoral (issu de la tumeur du patient ou du modèle généré) sera greffé en sous-cutané chez la souris immunodéficiente (Swiss Nude mâle) âgée de 6 à 8 semaines.

Pour ce projet, la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

- Remplacement

La réalisation d'études précliniques fiables nécessite l'utilisation de modèles animaux reproduisant fidèlement les caractéristiques des tumeurs humaines. Les tumeurs urologiques se caractérisent par une grande variabilité cytogénétique entre les individus et sont également hétérogènes au sein même de la tumeur. La validation préclinique d'un nouveau traitement passe donc par l'utilisation d'un large panel de modèles porteurs de tumeurs aux caractéristiques variables. Or, jusqu'à présent, les modèles d'étude en oncurologie se basent sur les lignées cancéreuses clonales qui ne reflètent pas l'hétérogénéité de la tumeur. Le développement de systèmes de culture 3D est en cours de développement mais est difficile à mettre en place. Par conséquent, aucune méthode de remplacement n'existe.

- Réduction

Nous utiliserons un nombre minimal d'animaux nous permettant d'une part, d'optimiser la prise de greffe et d'autre part, d'obtenir assez de matériel à la fois pour le maintien du modèle et les analyses/expériences ultérieures. Chaque année, nous recueillons près de 100 prélèvements de tumeurs rénales, 25 prélèvements de tumeurs vésicales et 50 prélèvements de tumeurs prostatiques. Ainsi,

en tenant compte du faible taux de prise de greffe et étant limité par la quantité de matériel biologique, le prélèvement initial (issu du patient) sera greffé au maximum sur 5 souris. Pour l'entretien du modèle, du passage 2 au passage 10, 10 souris par passage et par modèle sont suffisantes pour atteindre l'objectif du projet.

En conclusion, près de 6000 animaux seront requis pour les 5 ans de ce projet.

- Raffinement

Ce projet sera réalisé au sein d'une animalerie agréée et par conséquent les animaux seront manipulés par du personnel habilité et soucieux de leur bien-être. En l'occurrence, le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux. Les souris seront nourries ad libitum et hébergées en groupe ; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif avec induction de plaies. Nous diminuerons la douleur et l'angoisse liées à l'acte chirurgical (xéno greffe en sous-cutané) en opérant sous anesthésie et en appliquant une analgésie locale au moment du réveil, phase pendant laquelle les animaux seront surveillés. Il est à noter que le développement tumoral en lui-même n'est pas douloureux pour les animaux et de toute façon ne dépassera pas les 1000 mm<sup>3</sup>.

6637. La dépendance aux drogues est une pathologie complexe induisant une plasticité à long-terme du cerveau en réponse à l'usage répété de drogues. C'est une maladie multi-factorielle dont les conséquences humaines, sociétales et économiques sont particulièrement lourdes. Parmi les mécanismes neurobiologiques impliqués dans les comportements addictifs, nous étudions les processus épigénétiques. Le cannabis est la substance illicite la plus populaire en Europe. Cette drogue active un système endogène dans le cerveau, qui comporte deux récepteurs. Le récepteur CB1 dont le rôle dans l'effet des drogues a largement été décrit et le récepteur CB2 dont les fonctions dans le cerveau restent très largement inexplorées.

Les mécanismes impliqués dans le fait que le cannabis conduise à l'usage d'autres drogues ne sont toujours pas clairement établis. Des études sur les rongeurs suggèrent que l'exposition régulière au cannabis facilite l'appréciation d'autres drogues, et notamment celle des opioïdes. Notre projet a pour but d'explorer le rôle du récepteur cannabinoïde CB2 dans la dépendance aux opiacés. Nous étudierons l'impact de son activation (unique ou répétée) sur le système opioïde dans des conditions basales ou dans un contexte de dépendance à la morphine. Nous évaluerons les régulations de l'expression des gènes et des protéines de ce système, notamment le récepteur opioïde mu. Nous examinerons également si des mécanismes épigénétiques sont impliqués dans ces neuroadaptations. Une étude équivalente contrôlée sera menée avec un agoniste du récepteur CB1. Au cours de la mise en place du traitement, nous vérifierons les éventuels effets du prétraitement avec un agoniste cannabinoïde sur les phénomènes nociceptifs thermiques induits par la morphine chronique.

Nous utiliserons comme modèles des souris sauvages ainsi que des souris génétiquement modifiées exprimant les récepteurs opioïdes mu fonctionnels, en fusion avec une protéine fluorescente rouge, qui nous permettront de visualiser les récepteurs mu directement dans le système nerveux.

Remplacement : Dans la mesure où nos travaux portent sur l'effet de drogues sur le cerveau, de leur dynamique neurobiologique et leurs substrats épigénétiques, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier.

Raffinement : Nous avons optimisé le type de traitement chronique afin de limiter au maximum le nombre total d'injections reçues par les animaux et nous suivons tout particulièrement le site d'injection pour l'apparition de rougeur.

Réduction : nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour permettre notamment des analyses statistiques et adapté ce nombre selon le type d'expérience (12 souris/groupe pour les analyses de biologie moléculaire et biochimique et 6 souris/groupe pour l'immunohistochimie). Les groupes expérimentaux sont notamment constitués de mâles et femelles.

Dans ce contexte de la règle des 3R, nous anticipons que ce projet nécessitera au total 1536 souris sauvages et 276 souris génétiquement modifiées. Ce projet comporte 4 procédures expérimentales.

6638. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les transferts de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps

(évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité.

L'effectif des animaux engagés dans chaque protocole est établi en corrélation avec la quantité d'immun-sérum à produire et selon les rendements précédemment obtenus. En se basant sur ces données, nous faisons une demande pour 15 protocoles, représentant 300 lapins.

Le temps d'immunisation est de 357 jours. Cette durée permet l'obtention d'une grande quantité d'anticorps spécifiques à un lot composé de plusieurs lapins.

Les immun-sérums récupérés sont ensuite purifiés par le client afin de récupérer les anticorps reconnaissant spécifiquement l'antigène d'intérêt. Ces anticorps sont produits en grande quantité pour entrer dans la fabrication de trousse de diagnostic à grande échelle.

Dans la production d'anticorps polyclonaux, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

6639. Plusieurs études cliniques ont montré un bénéfice à combiner l'immunothérapie à la chimiothérapie pour améliorer l'efficacité antitumorale. Cette combinaison offre des perspectives intéressantes notamment dans le cadre des chimiothérapies inductrices de mort immunogène ou ICD (pour immunogenic cell death). En effet, ces drogues induisent un type de mort cellulaire particulier qui stimule une réponse immunitaire antitumorale cytotoxique. De plus, il a été montré 1°) qu'une restriction calorique par le jeûne avant traitement anticancéreux permettait d'améliorer l'efficacité du traitement notamment par régénération de cellules immunes et 2°) que la flore intestinale peut jouer un rôle important dans l'établissement de la réponse immunitaire antitumorale. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de traitements anticancéreux immunomodulateurs combinés à des composés capables de mimer les effets biochimiques du jeûne.

Par la suite, nous évaluerons le rôle du microbiote intestinal dans cette stratégie thérapeutique. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale. Pour se faire, nous projetons d'utiliser des souris C57Bl/6 sauvages (maximum de n=3672) et immunodéficientes (maximum n=288). Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des études de croissance tumorale et des analyses immunologiques *ex vivo*. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Le nombre d'animaux par groupe sera de 8 ou 10 (selon les procédures envisagées) et les expériences seront effectuées au maximum 3 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. Le projet regroupe 5 procédures séquentielles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

6640. Les cellules NK sont des lymphocytes de l'immunité innée connus pour leur rôle au cours des réponses anti-tumorales. Ces cellules sont en effet capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales grâce à des récepteurs membranaires. Cependant, l'engagement chronique de ces récepteurs conduit à la perte de fonction des cellules NK et à leur épuisement. Cette situation explique que de nombreuses tumeurs échappent au contrôle exercé par les cellules NK. La restauration de fonctions effectrices optimales

dans les cellules NK épuisées, en réinstaurant leur contrôle sur la tumeur, est donc un objectif de portée thérapeutique. Cet objectif nécessite au préalable de connaître les mécanismes présidant à l'induction de l'épuisement afin de pouvoir les contrecarrer.

Nous aimerions en particulier caractériser le rôle de la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) dans l'induction de l'épuisement. Cette voie intègre en effet une grande variété de signaux extracellulaires (présence de nutriment, d'oxygène, de facteurs de croissance...) pour contrôler en aval le métabolisme cellulaire. Les fonctions effectrices des cellules NK dépendent de l'activation de la voie mTOR. D'autre part, certains résultats suggèrent que l'activité de la voie mTOR est régulée au cours de l'épuisement. Ce projet se propose donc de reproduire *in vivo* chez la souris l'induction de l'épuisement des cellules NK dans un contexte tumoral. L'objectif étant de tester le rôle de la voie mTOR sur l'induction de l'épuisement. Cet objectif sera poursuivi à l'aide de modèles de souris transgéniques ou en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de la voie mTOR utilisés en clinique.

Ce type de projet nécessite l'utilisation de modèles animaux, le nombre d'interacteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu étant trop nombreux et leurs interactions trop complexes pour pouvoir être modélisés *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (512), des techniques de pointe permettant la mesure précise de l'activation des voies de signalisation (cytométrie en flux multiparamétrique, cytométrie d'image) seront utilisés. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Nous avons défini des points limite au-delà desquels les animaux seront mis à mort.

6641. L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O<sub>2</sub>) pour alimenter tout l'organisme. Il est estimé de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucuns permettent à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparaît primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe de 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 120 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal.

6642. L'évaluation de la sécurité pour l'homme de toute une série de produits qui vont du médicament au produit chimique est un processus complexe. Des méthodes informatiques (*in silico*) et des expérimentations faisant appel à des cultures de cellules (*in vitro*) sont utilisées. Mais des animaux de laboratoire essentiellement des rongeurs sont aussi utilisés dans des essais (toxicologiques, pharmacologiques, de tolérance) pour vérifier l'innocuité ou l'absence de risques à l'égard (selon le cas) de l'homme, des animaux, et/ou de l'environnement. Cette étape capable d'apporter une information, certes incomplète, mais fiable, est décrite dans des textes législatifs nationaux, européens ou internationaux qui précisent la nature des tests à réaliser avec les animaux de laboratoire. La réglementation prend en considération également les conditions d'utilisation de l'animal de laboratoire pour assurer son bien-être (directive 2010/63/UE, convention STE 123 et le décret français 2013-118).

La compétence du personnel en charge des animaux et la maîtrise des techniques appliquées sur l'animal de laboratoire font partie des paramètres fondamentaux à maîtriser pour la protection de l'animal. Cela nécessite, en plus d'une formation initiale spécifique des chercheurs et techniciens, le maintien des compétences par une formation continue tout au long de leur exercice. Le but de ce projet est de décrire l'utilisation des animaux dans le cadre de la formation (ou de vérification des compétences) du personnel.

La liste des techniques que le technicien chercheur doit maîtriser dans le laboratoire est définie par le responsable de la formation. Pour chaque technique un référent a été nommé (sur la base de son expérience et de ses compétences spécifiques relatives au geste technique concerné).

Chaque référent met en place une formation pour tout nouveau chercheur/technicien. Pour le maintien de la compétence, le référent définit le rythme minimal de manipulation pour garder la dextérité nécessaire au bon geste technique. Chaque chercheur/technicien est également responsable de son niveau d'expertise à un temps donné et doit demander à maintenir son niveau de formation s'il en ressent le besoin.

Afin de respecter le principe de réduction du nombre d'animaux utilisés, les formations seront, dans la mesure du possible, réalisées sur des animaux non sélectionnés pour la réalisation de projets de recherche. La commande d'animaux spécifiques à ce projet sera donc exceptionnelle et réduite au strict minimum. Si l'on considère tous les animaux, y compris ceux provenant des animaux non utilisés en étude, 300 rats et 100 souris par an seront nécessaires, soit 1500 rats et 500 souris pour 5 ans pour un nombre moyen de

50 chercheurs et techniciens. La formation ou le maintien des compétences peut également se faire sur des animaux en matière synthétique pour les premiers gestes.

Ce projet ne concerne que des techniques faiblement invasives. Les animaux seront soumis aux mêmes attentions pour le maintien de leur bien-être que l'ensemble des animaux de l'établissement. Notamment, le suivi quotidien (incluant le week-end) sera aussi complet et l'application des points limites sera identique à celle définie pour les animaux en études.

6643. En élevage porcin, les traitements par la colistine, un antibiotique, sont fréquents pour contrôler les diarrhées apparaissant après le sevrage des animaux. Jusqu'à fin 2015, la résistance à la colistine paraissait relativement rare pour les Entérobactéries (bactéries hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces microbiennes, du tube digestif de l'homme et des animaux) d'origine animale ou humaine en Europe. Fin 2015, un gène de résistance à la colistine nommé *mcr-1*, transférable, porté par un plasmide (molécule d'ADN circulaire transférable entre bactéries), a été détecté d'abord en Chine, puis dans de nombreux pays, sur des souches bactériennes d'origine animale ou humaine. L'existence de ce plasmide risque de favoriser la diffusion de cette résistance entre les souches de bactéries et entre les animaux. L'objectif de ce projet est d'étudier la diffusion de cette résistance, chez des animaux non traités ou traités avec la colistine, aux doses prescrites ou utilisées sur le terrain. Pour cela deux procédures seront conduites en animaleries protégées sur un total de 58 porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques, âgés de 6 semaines. Les porcs seront inoculés ou non, par voie orale, avec une faible ou une forte dose d'une souche de bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) non pathogène résistante à la colistine, porteuse du gène *mcr-1*. Des animaux contacts non inoculés seront placés dans les parcs des animaux inoculés. Les porcs inoculés ou contacts seront ensuite non traités ou traités à l'aide de colistine. Des prélèvements de matières fécales seront collectés régulièrement jusqu'à 10 semaines d'âge sur l'ensemble des animaux utilisés, pour contrôler l'implantation de la souche inoculée, évaluer la diffusion du gène *mcr-1* depuis la souche inoculée vers d'autres souches du tube digestif et comparer les niveaux d'excrétion de souches résistantes à la colistine et du gène *mcr-1*.

Les résultats permettront d'une part d'estimer la transmission horizontale (de porc à porc) des souches résistantes en fonction de la dose d'inoculation, et d'autre part, d'évaluer l'impact de l'administration de colistine sur l'excrétion de bactéries résistantes et de gènes de résistance dans les matières fécales.

Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur espèce cible. Dans un but de réduction, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Le protocole expérimental ne doit pas entraîner de souffrance animale, dans la mesure où 1) les inoculations et traitements sont faits par voie orale, 2) la souche de *E. coli* utilisée n'est pas pathogène chez le porc et 3) les prélèvements sont collectés lors de la prise de température deux ou trois fois par semaine maximum et n'engendrent pas de souffrance ou de stress chez les porcs. Les animaux sont vus au moins une fois par jour ; ils sont élevés en groupe, disposent d'objets manipulables, ont accès à l'alimentation et à l'eau à volonté, ont de la lumière de 7 h 30 à 18 h 00 et disposent de lampes chauffantes et de plaques de couchage. Ils sont pesés chaque semaine et leur température est mesurée chaque jour, afin de surveiller l'état de santé des animaux. Enfin, des prélèvements d'organe seront également collectés sur les animaux après euthanasie en fin d'essai.

6644. L'ataxie de Friedreich est une pathologie humaine d'origine génétique entraînant des troubles cardiaques et neurologiques majeurs.

L'origine génétique est documentée et se centre sur l'expression d'une protéine : la Frataxine (FXN).

La perte d'expression de cette protéine est ainsi responsable de troubles cellulaires entraînant la pathologie.

Afin de mettre en place des thérapies pour cette pathologie, des modèles murins ont été développés de manière ciblée, visant à cibler les différentes aires thérapeutiques (cardiaque, système nerveux central...).

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

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

Dans ce nouveau projet, nous chercherons donc à traiter les symptômes cardiaques observés chez les animaux mutants afin d'empêcher la dégradation de leur état classiquement observée. Le traitement consistera dans l'injection de vecteur visant à exprimer la frataxine dans les cellules déficientes.

Trois groupes d'animaux seront utilisés :

- 8 animaux témoins, non traités, injectés uniquement avec le véhicule du vecteur
- 8 animaux mutés non traités, injectés uniquement avec le véhicule du vecteur
- 8 animaux mutés traités avec une injection du vecteur à visée thérapeutique

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

Un suivi de la fonction cardiaque sera effectué avant le traitement au moment du sevrage, puis surveillé en semaine 5 et 7, par échographie.

Un suivi quotidien de l'état des animaux sera aussi effectué pour s'assurer de leur bien-être, ainsi qu'un suivi de poids hebdomadaire. Par ailleurs, des prélèvements sanguins seront effectués à 3, 5 et 8 semaines pour suivre certains marqueurs du système cardiaque. L'échographie et les prélèvements sanguins seront effectués sous anesthésie gazeuse pour minimiser autant que possible la souffrance ou le stress des animaux.

Ce protocole utilisera donc 24 animaux, ce qui constitue un nombre minimum pour pouvoir conclure, tout en étant réduit afin de satisfaire aux exigences de réduction en vigueur. Il n'est pas par ailleurs possible d'utiliser d'autre modèle que le modèle animal pour caractériser l'efficacité thérapeutique de ce composé.

Dans un second temps, et selon les résultats obtenus, un second protocole avec un second candidat thérapeutique pourrait être réalisé, avec de nouveau 24 souris, pour un total de 48 animaux utilisés dans l'ensemble de l'étude.

6645. L'interleukine (IL)-3 est une molécule impliquée dans la communication entre les cellules immunitaires, autrement dit une cytokine, qui joue un rôle clé dans la réponse immunitaire. En effet, de plus en plus d'études suggèrent un rôle crucial de l'IL-3 au sein des réponses inflammatoires, en plus de celui joué par cette cytokine dans l'hématopoïèse. Par exemple, l'absence de l'IL-3 induit un retard de l'expulsion des parasites lors d'infestation par un nématode. Cette cytokine a aussi été impliquée dans la pathogenèse précoce de la polyarthrite rhumatoïde ainsi que comme facteur aggravant la sévérité des chocs septiques. Enfin, l'IL-3 a également été impliquée dans le développement des allergies cutanées et celles des voies respiratoires. Ces exemples permettent de prendre la juste mesure de l'importance de l'interleukine-3 dans l'étude de diverses pathologies actuelles.

Toutefois, les outils classiques de biologie moléculaire ne permettent pas d'étudier la production d'IL-3 au cours du temps ni de quantifier de façon précise la production de cette cytokine au sein d'un type cellulaire donné. C'est pourquoi notre équipe a développé un nouveau modèle murin permettant de traquer les cellules productrices d'IL-3. En effet, au sein de ces souris, les cellules produisant de l'IL-3 produiront également la GFP, une molécule fluorescente verte, que l'on pourra détecter et qui nous permettra de palier aux inconvénients des méthodes déjà existantes. De plus, cet outil pourra être utilisé par de nombreuses équipes de recherches travaillant sur diverses physiopathologies impliquant l'IL-3.

Néanmoins, l'utilisation de ce rapporteur est soumise à la validation de celui-ci. Pour ce faire, il nous faut démontrer que les cellules produisant l'IL-3 produisent également la GFP. Nous avons déjà employé des méthodes *in vitro* pour cela, et souhaitons maintenant utiliser des techniques *in vivo* pour compléter ces données. Récemment, une étude a identifié un grand nombre de cellules productrices d'IL3 dans un modèle murin de septicémie. Pour vérifier le bon fonctionnement de notre rapporteur, nous souhaitons appliquer ce protocole à notre rapporteur, afin de valider son efficacité.

Remplacement : la génération de cellules productrices d'IL-3, dans le cadre de pathologies complexes telles que la septicémie, nécessite l'interaction de plusieurs types cellulaires au sein de plusieurs organes. Ainsi, des cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les lymphocytes B, et certains granulocytes vont être à l'œuvre dans les organes lymphoïdes secondaires que sont la rate et les ganglions lymphatiques. Nous n'avons pas, pour le moment, de système permettant de reproduire ces phénomènes *in vitro*, ce projet nécessite donc l'utilisation d'expériences *in vivo*.

Réduction : Le nombre total d'animaux pour cette étude sera de 90 souris. Ceci nous permettra d'acquérir le geste chirurgical, d'identifier les lymphocytes B producteurs d'IL-3, et de vérifier l'efficacité de notre lignée reproductrice. Le nombre d'animaux prévu permettra d'obtenir au minimum 3 groupes de 5 animaux par génotype, si nous devons faire face à une mortalité de 50% (risque de mortalité induit par ce type de protocole), ce qui nous sera nécessaire pour exploiter statistiquement les résultats scientifiques.

Raffinement : L'induction de la septicémie va nécessiter une opération de chirurgie qui sera effectuée sous anesthésie générale. Afin de soulager les douleurs post-opératoires, un analgésique sera administré toutes les 12 heures aux animaux durant 48 heures. De plus, afin de faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau, ces dernières seront placées directement dans la cage de l'animal. L'expérience sera menée sur quatre jours, conformément à l'étude ayant identifié les cellules productrices d'IL3. Le suivi post-opératoire a lieu toutes les 30 minutes jusqu'à 2h après l'opération puis lors de l'administration des analgésiques. A cette occasion, les animaux présentant une difficulté à la locomotion induisant l'impossibilité de se nourrir ou une chute de masse corporelle de plus de 20% de la masse initiale de l'animal seront euthanasiés.

6646. Les stéroïdes agissent sur de nombreux organes en se fixant sur des récepteurs capables de modifier l'expression de gènes spécifiques. L'un d'eux, le Récepteur Minéralocorticoïde (MR) lie les hormones minéralocorticoïdes telles que l'aldostérone, ainsi que les hormones glucocorticoïdes notamment dans le rein où il participe à la régulation de l'équilibre hydro-sodé. Ces hormones jouent des rôles importants et variés dans l'organisme. Une altération de la fonction du MR est impliquée dans le développement des maladies cardiovasculaires, rénales ou métaboliques. Des molécules antagonistes, bloquant son action, améliorent la fonction cardiaque des patients, certains troubles métaboliques, la fibrose rénale et ont aussi un impact sur le système nerveux central (mémoire, processus cognitifs, régulation du stress et de l'humeur). Les différents mécanismes impliqués dans la fonction du MR sur ces organes ne sont pas toujours bien connus mais peuvent être explorés de manière complémentaire à la fois à l'aide de modèles cellulaires *in vitro* et chez l'animal, notamment la souris, *in vivo*. Les modèles cellulaires ne permettent en effet de récapituler que très partiellement le fonctionnement des organes rendant indispensable l'utilisation de l'animal pour mieux comprendre le rôle du MR en physiologie et pathologie.

Pour étudier le rôle du MR *in vivo*, nous utiliserons des souris transgéniques générées précédemment par notre laboratoire où des copies supplémentaires du gène codant pour le MR ont été intégrées dans le génome, augmentant ainsi son expression. Ces copies supplémentaires s'expriment (surexpression) dans le rein, le cœur, le cerveau et le tissu adipeux, organes où le rôle de ce récepteur est important en physiologie et en pathologie mais reste encore à préciser. Ces animaux transgéniques (P1.hMR) ne présentent pas de morbidité particulière. Dans ce projet, l'effet de la surexpression du MR sera analysé dans le tissu adipeux brun, un type de graisse produisant de la chaleur, impliqué ainsi dans la régulation thermique et aussi bénéfique pour le métabolisme, grâce à l'expression de la protéine UCP1. Des groupes de 10 nouveaux nés contrôles et 10 transgéniques (nombre nécessaire pour obtenir des résultats exploitables) seront exposés au froid (4°C) ou laissés sous la mère. Ces expériences seront répétées avec des animaux âgés de 15 jours, juste avant le sevrage, où le fonctionnement du tissu adipeux brun est moindre. Les nouveaux nés sont utilisés car

le développement et l'activité du tissu adipeux brun sont très importants à ce stade et diminuent fortement par la suite, et l'exposition au froid permet de stimuler fortement l'expression du gène UCP1 ainsi que la production de chaleur. L'effet de la surexpression du MR et de la température sur l'expression de ce gène sera ensuite mesuré. Des médicaments bloquant l'action du MR étant utilisés chez les patients présentant des pathologies cardiovasculaires, il est utile de connaître l'action de ce récepteur sur un tissu influençant la fonction métabolique. Ce projet nécessitera l'utilisation de 120 animaux. Comme méthode alternative de remplacement, des modèles cellulaires d'adipocyte brun *in vitro* sont utilisés pour étudier les aspects mécanistiques et moléculaires de l'action du MR sur le tissu adipeux brun. Les animaux, nouveaux nés et âgés de 15 jours, sont sacrifiés immédiatement après l'exposition au froid, qui provoque un engourdissement rapide. D'autre part, les conditions d'élevage sont conformes à la législation en vigueur concernant le nombre d'animaux par cage, les membres d'une même portée et de même sexe sont laissés ensemble (à part pour les croisements). Aussi, si un animal se montre agressif ou s'il est blessé, il est sacrifié. Enfin les souris disposent d'enrichissement tel que des maisons en cartons et des copeaux de carton pour faire des nids, raffinant ainsi leurs conditions de vie.

6647. Le présent projet concerne l'évaluation d'un produit immunologique destiné à stimuler le système immunitaire des carnivores domestiques et des animaux d'élevage.

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

En vue de respecter les 3R, le test d'efficacité avec épreuve létale pourra être remplacé par un test *in vivo* de gravité moindre qui détermine les cytokines induites après traitement par ce produit immunologique. Pour ce faire, dans le cadre de Recherche et Développement de nouvelles générations de ce produit immunologique et dans le cadre d'un remplacement d'un test d'activité létal par un test non létal, 2 procédures sont décrites dans le présent projet :

Procédure 1 : étude de la réponse cellulaire induite par le traitement immunologique.

Procédure 2 : étude de la réponse cellulaire induite par le traitement immunologique après épreuve.

Si les résultats de la procédure 1 sont probants, le test d'efficacité avec épreuve (test de libération de lots) sera abandonné pour être remplacé par un test d'efficacité avec sécrétion de cytokines.

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

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

- L'enrichissement apporté dans les cages des animaux,

- La définition de points limites adaptés pour chaque procédure permettant la réduction de la souffrance chez les animaux.

Le nombre d'animaux envisagé sera au maximum de 7200 rongeurs sur 5 ans.

6648. Parmi les maladies inflammatoires d'origine auto-immune, la polyarthrite rhumatoïde représente le rhumatisme inflammatoire le plus fréquent. La prévalence de cette pathologie est de 0.5 à 2 pour cent dans la population mondiale et on constate l'apparition d'environ 80 nouveaux cas pour 100000 habitants par an en France. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique entraînant des douleurs articulaires intenses chez les patients pouvant mener à un handicap moteur. Les articulations majoritairement touchées sont les articulations des doigts des mains et des pieds, des poignets, des chevilles et des genoux mais la maladie peut s'étendre à de plus nombreux sites. Dans la stratégie thérapeutique actuelle, l'utilisation de médicaments anti-inflammatoires appartenant à la classe pharmacologique des corticoïdes est controversée du fait de nombreux effets indésirables graves liés à ces molécules. Notre équipe développe des systèmes nanoparticulaires permettant d'encapsuler des molécules thérapeutiques et d'augmenter leur libération au niveau du site pathologique tout en permettant de diminuer les doses responsables d'effets indésirables dans les autres organes. Dans ce projet, nous proposons un nanomédicament innovant de par sa méthode de fabrication, injectable par voie intraveineuse et contenant un corticoïde dans le but de traiter de manière prolongée les symptômes de la polyarthrite rhumatoïde. Ce nanomédicament agirait comme un réservoir de principe actif dans l'organisme et libérerait ce dernier de manière prolongée, permettant de diminuer la fréquence des injections chez les patients. De plus, du fait de sa très faible taille (100-150nm), il serait capable de se concentrer au niveau des articulations inflammatoires à traiter, donc d'augmenter l'efficacité du traitement et de diminuer l'apparition d'effets indésirables. Il serait alors possible d'introduire ces corticoïdes dans la stratégie thérapeutique du traitement chronique de la polyarthrite rhumatoïde. L'objectif de ce travail est d'étudier le devenir du nanomédicament dans l'organisme après son administration ainsi que d'évaluer son efficacité thérapeutique. Ces études *in vivo* sont indispensables car, jusqu'à présent, la connaissance des organismes vivants est loin d'être complète et donc il n'est pas possible de les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles informatiques. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour ce type d'étude. Nous utiliserons pour cette étude un total de 1035 souris DBA/1 car cette lignée présente la plus haute incidence du modèle d'arthrite de 80-100 pour cent en comparaison aux autres lignées murines. Un modèle pathologique de polyarthrite chez la souris est utilisé car des études de pharmacocinétique et de biodistribution sont nécessaires afin d'envisager des études d'efficacité de notre médicament. Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R : Ces études *in vivo* ne peuvent pas être remplacées car, jusqu'à présent, la connaissance des organismes vivants est loin d'être complète, il n'est donc pas possible de les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles *in silico*. Durant leur transport dans l'organisme depuis le site d'administration, les médicaments sont potentiellement modifiés par plusieurs organes et systèmes : ces multiples processus ne peuvent pas être reproduits dans un tube à essai. De telles études doivent donc être menées sur des animaux entiers, tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés en effectuant des expériences d'optimisation afin de choisir le bon nombre d'animaux nécessaires pour l'obtention de résultats statistiquement

significatifs et raffiner en veillant à réduire au maximum la douleur, souffrance ou angoisse des animaux lors de l'étude. Le modèle pathologique d'arthrite chez la souris régresse spontanément, ce modèle permet donc de limiter la douleur ressentie par la souris en comparaison aux modèles qui induisent une arthrite à vie.

6649. L'hémophilie est une maladie de la coagulation sanguine caractérisée par le déficit d'un facteur de la coagulation dû à une mutation génétique ou à la présence d'anticorps contre l'un de ces facteurs. Ses manifestations cliniques, des hémorragies qui peuvent atteindre différents organes, sont proportionnelles au déficit du facteur de la coagulation.

Il existe plusieurs types d'hémophilie selon le facteur de coagulation déficitaire : les plus communes étant l'hémophilie A (déficience en facteur VIII) et l'hémophilie B (déficience en facteur IX). Celles-ci ont aujourd'hui à leur disposition des facteurs de substitutions plasmatiques et recombinants efficaces et sûrs. Cependant, les patients peuvent développer des anticorps inhibiteurs contre ces produits de substitution et sont alors dans des situations pathologiques beaucoup plus complexes. En effet, le retour à une hémostase efficace (arrêt des saignements) est généralement obtenu par l'utilisation de facteurs alternatifs activés mais tous les patients ne répondent pas à ces traitements. Une frange de la population des hémophiles A et B sévères ne dispose ainsi d'aucun traitement efficace et sûr.

Dans le cadre du développement de nouveaux traitements dans le domaine de l'hémostase, nous proposons d'identifier, sélectionner et valider de nouvelles protéines thérapeutiques qui ciblent cette partie de la population hémophile.

Le facteur X (FXa) fait partie des protéines jouant un rôle crucial et central dans le mécanisme de la coagulation. Cette molécule clive la molécule de prothrombine et entraîne la génération de thrombine, puis du caillot, arrêtant ainsi le saignement. En situation physiologique, le FXa a un temps de demi-vie plasmatique très court et une activité thrombotique potentielle très importante. Nous développons actuellement plusieurs types de molécules de FX modifiées de façon à avoir soit une demi-vie longue soit un potentiel thrombogène réduit qui permettraient de restaurer la coagulation et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'hémophilie.

Des études préliminaires *in vitro* dans du plasma de souris et *in vivo* dans des souris hémophiles A ont montrées que le modèle souris ne permet pas de tester l'efficacité de nos molécules candidates. A contrario, nos molécules candidates sont efficaces *in vitro* dans le plasma de lapin rendu hémophile A par ajout d'un cocktail d'anticorps anti-FVIII.

Le premier objectif de notre projet est d'évaluer l'efficacité de nos molécules candidates à restaurer une coagulation normale chez un modèle de lapins hémophiles A. Cependant, le recours au modèle pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité chez l'animal est irremplaçable. En effet, les essais *in vitro* ne reproduisent pas strictement les conditions sanguines lors d'hémorragies, puisqu'ils sont non circulants et n'intègrent pas l'aspect d'élimination des produits. De même, l'influence du flux sur l'efficacité des molécules et la présence des cellules circulantes du sang, bien qu'importantes pour le maintien de l'homéostasie et l'efficacité de la coagulation, ne peuvent être pris en compte lors d'essais *in vitro*. Le passage chez l'animal permettra de vérifier les données d'ores et déjà obtenues *in vitro*, et de comparer dans un système plus pertinent et plus proche de la réalité physiologique, différents composés entre eux. Les doses effectives de chaque produit, leurs paramètres pharmacocinétiques et leurs biodistributions pourront ainsi être obtenus et mesurés. Ces résultats sont la base de la prise de décision de passage en développement d'un produit en vue de leur expérimentation chez l'homme.

Les lapins utilisés sont des animaux spécialement élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Tout au plus, ce projet prévu sur 3 ans nécessitera 141 lapins. Ce nombre a été déterminé grâce aux données de la littérature. Il a été réduit au minimum nécessaire afin de recueillir un nombre significatif de données pour la réalisation de tests statistiques valides. Les animaux sont hébergés selon les règles de bien être en vigueur dans l'animalerie. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre (administration de myorelaxant et anesthésie générale). Enfin, l'application de critères d'arrêts (présence anormale d'hématomes, poil hérissé, absence de mobilité, état de maigreur apparent, trouble respiratoire) ainsi que le suivi quotidien des animaux hébergés permettent de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé (état général, mobilité et poids) tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

6650. Le développement des communications à distance, implique des technologies dont l'impact sur la santé des usagers soulève des interrogations. Pour ce qui concerne la téléphonie mobile, une part des questions actuelles concerne les risques encourus par la répétition des expositions cérébrales à des radiofréquences émises par les téléphones portables et sur des variations possibles de la sensibilité des sujets en fonction de leur âge ou de la survenue d'une pathologie affectant directement ou indirectement le système nerveux central (SNC). Pour répondre à ces questions très importantes pour la protection des usagers, il est nécessaire de mieux comprendre les effets des radiofréquences sur le SNC. De très nombreuses maladies ou lésions, peuvent entraîner une réaction inflammatoire qui modifie de manière durable l'activité de circuits neuronaux, sans pour autant empêcher les patients d'utiliser normalement leur téléphone portable. L'objectif de notre programme est de déterminer dans quelle mesure l'exposition répétée à des ondes électromagnétiques émises par les téléphones portables peut entraîner des réactions cellulaires et des modifications de l'activité neuronale dans le cortex cérébral, lorsque ces expositions surviennent dans le contexte d'un épisode inflammatoire transitoire affectant le SNC. Cette recherche impose des investigations biochimiques, histologiques et électrophysiologiques du tissu cérébral, qui nécessitent l'utilisation d'animaux de laboratoire. La substitution par des modèles *in vitro* de cultures cellulaires est impossible car les effets analysés dépendent directement de la structure du cerveau et de ses échanges avec les organes périphériques par voies nerveuses ou humorales. La démarche expérimentale repose sur l'induction d'un état inflammatoire transitoire chez des rats et des rats adultes au moyen de l'injection d'un composé stérile dont les effets et la tolérance sont bien connus. Des protocoles validés limiteront fortement l'intensité et la durée de l'inconfort ou de l'angoisse des rats adultes ou des ratons qui seront utilisés, et



permettront de réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaires, pour obtenir des résultats concluants. Des procédures d'anesthésie éviteront toute douleur ou angoisse prolongées, les rats utilisés ne seront séparés de leurs mères que pendant quelques minutes avant leur sevrage. 48 rats adultes et 48 rats de la lignée Wistar seront utilisés pour obtenir des données très diversifiées et statistiquement contrôlées. Ce projet contribuera à l'élargissement des connaissances d'intérêt direct pour l'élaboration de politiques de santé publique.

6651. Ce projet a deux objectifs scientifiques interdépendants : (1) l'étude des mécanismes moléculaires contrôlant la multiplication des cellules souches dans l'embryon de macaque, et (2) la génération de macaques transgéniques en utilisant la technologie des cellules souches embryonnaires pluripotentes (comme chez la souris). A terme, ces recherches permettront (1) de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'embryogénèse précoce chez l'homme, (2) de modifier l'expression génique de manière ciblée dans le temps et dans l'espace et d'étudier les conséquences de ces modifications ciblées sur le développement embryonnaire et fœtal, et (3) de fabriquer des modèles macaques de maladies génétiques humaines, plus pertinentes que les modèles murins actuellement disponibles. La pierre angulaire du projet est la production d'embryons grâce aux techniques de fécondation *in vitro* et, le cas échéant, du transfert de ces embryons dans l'utérus de femelles porteuses pour leur permettre de poursuivre leur développement jusqu'à terme. Ces expériences, parfaitement maîtrisées chez la souris, seront réalisées chez le macaque, la seule espèce suffisamment proche de l'Homme pour que la pertinence des résultats obtenus pour la physiologie humaine ne puisse être contestée et le seul modèle animal qui permet d'étudier le développement du système nerveux central complexe propre aux primates (dont l'homme). Au maximum, 25 femelles et 2 mâles rhesus, et 10 femelles de macaque cynomolgus âgées de 3 à 10 ans participeront aux procédures de classes « légère » à « modérée » prévues dans le projet (37 animaux plus 5 macaques rhesus nouveau-nés chimères qui seront hébergés, élevés jusqu'à l'âge adulte, donc 42 animaux au total). Le principe de remplacement n'est pas applicable dans ce projet qui étudie des fonctions qui ne peuvent être ni modélisées chez des espèces inférieures, ni étudiées sur des modèles cellulaires. Le projet répondra en revanche de façon stricte aux exigences de réduction et de raffinement en 1) optimisant le protocole de stimulation pour atteindre l'objectif de 150 blastocystes avec le moins d'animaux possible, 2) améliorant la qualité des lignées de cellules souches embryonnaires pluripotentes de façon à augmenter leur efficacité et réduire le nombre d'embryons utilisés, 3) utilisant la méthode du renforcement positif (clicker training) qui permet d'obtenir la coopération des animaux sur un mode de volontariat et de réduire leur stress, et 4) mettant en place de multiples formes d'enrichissement (hébergement social en grandes volières équipées de matériel permettant exploration et fourrageage).

6652. Le diagnostic et le traitement de la maladie d'Alzheimer sont deux défis majeurs de santé publique aujourd'hui. Bien que la maladie soit bien caractérisée, notamment avec l'observation de l'agrégation de la protéine Tau dans les cellules neuronales, ses causes restent inconnues. Le projet présenté ici a pour but de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'élimination des agrégats de Tau. Les résultats de cette étude aideront ainsi à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et donc au développement de nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies en général. Ils devraient également faciliter le dépistage de la maladie grâce à l'identification de meilleurs biomarqueurs d'imagerie de sa progression.

Ici, nous utiliserons un nouveau modèle *in vivo* d'agrégation de la protéine Tau chez le rongeur. En injectant dans le cerveau des animaux des vecteurs viraux construits pour surproduire Tau et conduire à son agrégation, nous caractériserons l'effet de cette agrégation. Le recours à des modèles rongeurs transgéniques chez lesquels il est possible de « voir » des types cellulaires ciblés (astrocytes, microglies...) permettra de faire des analyses moléculaires spécifiques à ces types cellulaires. Puis nous étudierons les conséquences fonctionnelles de l'accumulation de ces différents agrégats sur le comportement de l'animal, le métabolisme du cerveau et l'intégrité de ses cellules. Nous analyserons ensuite la correspondance entre l'état d'agrégation de Tau et le signal produit par différentes techniques d'imagerie du cerveau : signal généré par des agents d'imagerie décrits comme spécifiques de Tau en tomographie par émission de positrons (TEP) ou signal obtenu par spectroscopie par résonance magnétique (RMN) sur le cerveau afin de quantifier les métabolites cérébraux spécifiques de différents types cellulaires. Le but ici est d'identifier un biomarqueur de la maladie qui indique l'état d'avancement de la pathologie de manière non invasive chez le patient.

Le recours au modèle rongeur est ici nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité des interactions structurelles et fonctionnelles de ces différents types de cellules du cerveau. La taille du cerveau des animaux permet de réaliser des examens d'imagerie. De plus, un modèle transgénique surexprimant des gènes rapporteurs spécifiques de types cellulaires nous permettra de faire des analyses moléculaires dans des populations cellulaires ciblées.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés. Leur nombre (2900) a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées pendant les 5 années de l'étude. Les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

6653. L'efficacité des anticorps anti-PD1 sur le cancer du poumon fait actuellement l'objet de nombreuses études cliniques. Cet anticorps monoclonal permet une réinduction de la réponse immunitaire qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses.

Cependant, certains patients développent une résistance à ce traitement. Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'activation du système immunitaire anti-tumoral permettant d'améliorer l'effet de thérapies anti-cancéreuses, notamment de l'anti-CTLA4 et du cyclophosphamide. Or chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale qui pourrait être impliqué dans la résistance aux traitements. Par conséquent, notre objectif est d'analyser l'influence de la flore intestinale sur la sensibilité au traitement anti-PD1. Pour cela, nous collectons les fèces de patients atteints de cancer du poumon afin de réaliser des transplantations fécales chez la souris, qui possèdera alors les bactéries de la flore intestinale des patients. Par ailleurs, nous administrerons des bactéries spécifiques ou des cellules immunitaires préalablement activées par des bactéries ayant été démontré (dans notre laboratoire) comme activant la réponse immunitaire anti-tumorale et favorisant l'effet de thérapies anti-cancéreuses. Puis, après injection de lignées tumorales pulmonaire, les souris seront traitées ou non avec l'anti-PD1. Ces manipulations vont nous permettre de caractériser la composition en bactéries de la flore intestinale des patients, en étudiant les conséquences sur la progression tumorale, l'efficacité anti-tumorale du traitement anti-PD1 ainsi que sur l'activation du système immunitaire. Ces résultats devraient également permettre de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une supplémentation en bactéries impliquées dans l'amélioration de la réponse au traitement anti-PD1.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *ex-vivo* du fait de sa complexité. Le projet nécessitera 7260 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, le nombre de prélèvements fécaux et l'étendue de la diversité de la flore intestinale.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de réduction et raffinement. D'une part, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, avec un système immunitaire complexe, proche de l'homme, porteur de tumeur). D'autre part, les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem sera optimisé afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentations. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux, en ayant recours à l'anesthésie et en suivant la croissance tumorale par imagerie.

6654. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Dans le cas particulier des AVC dits ischémiques, un caillot de sang (thrombus) bouche une artère cérébrale, provoquant ce qu'on appelle une embolie cérébrale. La reperfusion (irrigation par le sang) du tissu cérébral peut être réalisée pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Alteplase) est le seul médicament ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aigüe de l'AVC ischémique. Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique. De plus, son efficacité est limitée : chez environ 50 % des patients, le traitement ne permet pas la recanalisation (ouverture d'un nouveau passage du sang) des artères embolisées.

L'objectif du présent projet est d'évaluer l'efficacité de traitement à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), une méthode d'imagerie non-invasive qui permet de recueillir des informations anatomiques, structurelles et fonctionnelles du cerveau. L'intérêt de cette technique est qu'elle autorise facilement le suivi de modèles animaux rongeurs sur le long terme. L'animal est anesthésié durant la totalité de l'examen IRM et sous surveillance pour les paramètres physiologiques respiration/température corporelle. Il s'agira plus précisément d'évaluer l'efficacité du traitement sur la recanalisation des artères embolisées et le rétablissement de la perfusion tissulaire au cours de l'administration du traitement.

Ce travail se situe dans le cadre plus général de la recherche de nouvelles thérapeutiques dans le traitement pharmacologique de l'AVC ischémique. Les données générées seront précieuses et nécessaires pour établir les schémas d'administration qui seront utilisés chez l'homme.

L'évaluation des propriétés thrombolytiques d'une molécule *in silico* ou *in vitro* ne permet pas de prédire à elle seule de son efficacité dans le cadre d'une intervention visant à limiter la taille des lésions cérébrales au cours d'un AVC ischémique chez l'Homme. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeux au cours de la reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisables par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez l'animal.

Au total, 348 rongeurs seront utilisés pour ce projet. Sur la base de notre expérience de ce modèle animal, le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude sera réduit au minimum garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats. Les animaux sont nés et élevés dans des établissements agréés pour leur utilisation à des fins scientifiques. A l'arrivée dans l'animalerie, les animaux seront hébergés en groupe sociaux, avec un enrichissement de la cage par des papiers favorisant la confection d'un nid. Des protocoles d'anesthésie ont été validés pour éviter toute souffrance lors de l'intervention chirurgicale conduisant à l'induction de l'AVC chez l'animal. Les traitements seront administrés 2h post-AVC de façon à mimer une situation proche de la clinique humaine. Une attention particulière sera apportée aux animaux les 4 premières heures après chirurgie pour détecter les critères d'arrêt définis dans le projet et dans ce cas procéder à une euthanasie. Tous les animaux seront euthanasiés au plus tard à 24 H post-AVC pour limiter leur souffrance.

L'étude d'imagerie proposée dans ce projet permettra de mettre en évidence *in vivo* les effets neuroprotecteurs des composés (volumes hémorragiques, taille des œdèmes/lésions cérébrales, intégrité de la barrière hématoencéphalique) et d'appréhender les mécanismes sous-tendants cette neuroprotection (recanalisation, microcirculation).

6655. La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une pathologie de la moelle osseuse et du sang qui se traduit par une augmentation du nombre de globules blancs circulants dans le sang. Cette pathologie est liée à un dysfonctionnement des cellules souches

hématopoïétiques. Ces cellules immatures donneront au cours de leur maturation toutes les cellules du sang (globules rouges, globules blancs et plaquettes). La LMC peut entraîner la formation de caillots et favoriser les saignements. Son évolution est lente. Avec le temps, la maladie peut devenir résistante aux traitements, les globules blancs ne sont plus capables d'effectuer leur rôle de défense contre les infections. La LMC peut aussi se transformer en une forme plus agressive appelée leucémie aiguë, pouvant conduire rapidement au décès du patient. En France, l'incidence de la LMC est de 807 nouveaux cas par an en 2012. Des traitements très efficaces, appelés inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), ont permis d'améliorer fortement la survie des patients. Cependant, à l'arrêt de ces traitements, la grande majorité des patients rechute. Dans les leucémies aiguës ou chroniques, les rechutes et les résistances aux traitements sont liées à l'existence de cellules souches leucémiques « endormies » appelées cellules souches leucémiques quiescentes. Celles-ci ne sont pas sensibles aux traitements classiques et persistent même lorsque la maladie est en rémission.

De nombreux travaux visant à comprendre le fonctionnement de ces cellules quiescentes de LMC ont mis en évidence des cibles potentielles de traitement. L'objectif du projet est d'atteindre ces cellules, d'en réduire le nombre, voire de les éradiquer complètement afin de prévenir les rechutes.

Des travaux récents, réalisés *in vitro*, ont mis en évidence la possibilité de diminuer voire d'éradiquer les cellules quiescentes de patients atteints de LMC en associant au traitement classique par ITK une molécule agissant sur un récepteur nommé PPARgamma. L'objectif du projet est de déterminer sur un modèle rongeur si l'association d'un ITK et d'un agoniste de PPARgamma peut aboutir à la guérison des patients atteints de LMC et non à la seule stabilisation de la maladie. Pour cela, le modèle *in vivo* est essentiel pour confirmer les résultats obtenus *in vitro* sur les cellules de patients, aucun système *in vitro* ne pouvant mimer à ce jour les interactions complexes d'un organisme vivant.

Le modèle rongeur nous semble le plus adapté car il est possible d'induire une LMC chez le rongeur mimant la maladie humaine. Les médicaments utilisés chez les patients peuvent être administrés aux rongeurs et sont efficaces sur cette espèce. Ce modèle a déjà été mis au point et est décrit dans plusieurs publications scientifiques. Le nombre d'animaux pour cette expérimentation est réduit au minimum nécessaire (43) afin de ne pas compromettre l'analyse des résultats.

Des échelles cliniques et l'application de critères d'arrêts ont été mis en place pour mener à bien l'expérimentation et permettent de veiller au bien-être des animaux. Pour leur éviter toute souffrance, les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie, avec analgésie si nécessaire. Les animaux sont hébergés en groupe sociaux avec des enrichissements du milieu tenant compte des besoins des rongeurs.

La combinaison des deux médicaments pourra être testée chez l'Homme dans le cadre d'essais cliniques. Les résultats de l'étude chez le rongeur permettront d'apporter des arguments solides à la généralisation de cette combinaison de traitement pour les patients humains. L'éradication des cellules souches leucémiques chez l'homme pourrait permettre l'arrêt des ITK, médicament coûteux et pouvant entraîner des effets secondaires, actuellement prescrits à vie.

6656. Les produits testés pour ces projets comprennent l'ensemble des produits utilisables en médecine vétérinaire et destinés à être utilisés chez les bovins, équins, porcins, ovins ou caprins (par exemple pour : le traitement d'infection bactérienne, d'infection parasitaire, de la douleur ou encore pour la maîtrise de la reproduction).

Ces projets ont pour objectif d'évaluer la pharmacocinétique (devenir d'une substance active dans l'organisme après son administration) des produits étudiés.

Ainsi, après administration du produit testé chez les animaux, des prélèvements biologiques (sang, lait, urine) sont réalisés afin d'étudier la libération et la diffusion de la substance active du produit.

Les quatre grands processus qui composent la pharmacocinétique sont :

- o l'absorption (passage de la molécule étudiée du site d'absorption vers le sang pour pénétrer dans la circulation systémique),
- o la distribution (liaison aux protéines plasmatiques et accumulation dans certains organes ou tissus),
- o le métabolisme (transformation du médicament par le système enzymatique de l'organisme),
- o l'élimination (élimination du principe actif par l'organisme sous forme inchangée, ou sous forme de métabolites).

La procédure expérimentale *in vivo* est nécessaire et ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

La conception de ces projets (sélection des espèces d'essai, statut physiologique, nombre, poids, doses sélectionnées et voies d'administrations) est basée sur les lignes directrices en vigueur, les informations disponibles issues des études *in vitro*, les données bibliographiques ainsi que sur l'utilisation clinique ultérieure prévue.

Grâce à une bonne standardisation des essais le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en évitant de compromettre les objectifs du projet. Ainsi, un total de 100 bovins, 100 équins, 100 porcins, 100 ovins, 100 caprins maximums sera utilisé au cours du projet sur une période de 5 ans. Ce nombre a été déterminé en fonction des données déjà disponibles sur les molécules étudiées et en fonction des analyses statistiques réalisées.

L'établissement au sein duquel les animaux sont hébergés fournit des conditions de maintenance adaptées. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'enrichissement pour leur bien-être (ex : litière, foin, brosse, pierre à lécher). La réglementation en vigueur relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques est respectée

Par expérience, ces protocoles ne sont pas susceptibles d'occasionner douleur, souffrance ou angoisse. Toutefois, la surveillance quotidienne "approfondie" de ces animaux en protocole assure, en cas de signes cliniques, le déclenchement de soins spécifiques sur les conseils d'un vétérinaire en accord avec le responsable de l'étude. De plus, dans un but de raffinement, la pose de cathéters est possible lorsque les prélèvements sanguins prévus sont nombreux ou fréquents.

Les résultats doivent permettre d'obtenir le profil pharmacocinétique des produits étudiés ; et donc de vérifier si ils présentent une bonne diffusion et un profil pharmacocinétique favorable (effet thérapeutique, durée d'action, absence de toxicité).

6657. Le Purpura Thrombopénique Immunologique (PTI) est une maladie du sang qui se traduit par une baisse anormale du nombre de plaquettes dans le sang (thrombopénie) et un risque accru de saignements (hémorragies). C'est une maladie auto-immune : les défenses immunitaires qui s'attaquent normalement aux éléments « étrangers » à l'individu détruisent aussi les plaquettes. C'est une maladie rare, touchant aussi bien les enfants que les adultes, avec une incidence annuelle (nombre de nouveaux cas par an) entre 1/62 500 et 1/25 600.

Le premier objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité de différents produits (protéines humaines d'origine plasmatisée ou recombinante) à visée thérapeutique pour le PTI. Avant administration d'un produit en développement chez l'homme, la réglementation impose de démontrer que le produit est actif/efficace dans un modèle animal dont la pathologie est proche de celle observée chez l'homme.

Nous utiliserons un modèle murin de thrombopénie induite par l'administration d'anticorps anti-plaquettes, reconnu pour l'évaluation des traitements du PTI.

Dans ce modèle, la sévérité de la thrombopénie est déterminée par le taux de plaquettes circulantes. Cette thrombopénie peut être induite de manière aiguë, par une injection unique d'anticorps anti-plaquette, ou chronique, par l'injection quotidienne de l'anticorps anti-plaquette à des doses constantes ou croissantes.

L'efficacité des produits testés est évaluée par la détermination du taux de plaquette durant la période d'exploration souhaitée. Dans le cas de l'évaluation d'un potentiel préventif, les produits sont administrés avant les anticorps anti-plaquettes. Dans le cas de l'évaluation d'un potentiel curatif, ils sont administrés une ou plusieurs fois après les anticorps anti-plaquettes.

En parallèle, nous utiliserons un modèle murin sain pour étudier l'évolution de la concentration des produits testés et établir un lien entre la concentration du produit et l'effet/l'efficacité observé. Plusieurs prélèvements sont nécessaires (maximum 5) pour caractériser au mieux l'évolution de la concentration en fonction du temps.

Les animaux utilisés sont spécialement élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Dans le cadre de ce projet prévu sur 5 ans, le nombre maximal nécessaire est de 4200. Ce nombre a été déterminé grâce aux données de la littérature et de données internes. Il a été réduit au minimum nécessaire afin de garantir la validité des résultats. Des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque injection afin de réduire la souffrance des animaux. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe associé à des éléments d'enrichissements permettent de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé (état général, mobilité et poids) tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

6658. Lors d'examen radiologique, la femme peut subir une exposition aux radiations au cours des 3 premiers mois de grossesse, période où elle ne sait pas forcément qu'elle est enceinte. On sait aujourd'hui que le cerveau est un organe particulièrement radiosensible, pendant son développement fœtal, car de nombreuses études suggèrent qu'une irradiation durant le développement embryonnaire (embryogenèse) peut entraîner des dommages de l'ADN provoquant des anomalies du cerveau (microcéphalie, retard mentaux...) et plus dramatiquement, la mort in utero.

Evaluer les effets de l'irradiation sur la production des neurones à partir des cellules souches et des progéniteurs nerveux (CSPN) au cours du développement fœtal est essentiel pour à terme, concevoir des traitements efficaces contre des irradiations accidentelles. Le but de l'étude est d'analyser dans les CSPN, le rôle de différentes protéines impliquées dans la réparation des dommages provoqués par l'irradiation.

Pour cela, aucune méthode *in vitro*, à ce jour, ne peut remplacer les mécanismes étudiés dans ce projet sur l'animal vivant. Nous avons donc choisi d'utiliser plusieurs modèles murins transgéniques qui permettent d'étudier les effets de l'irradiation et plus précisément d'étudier le rôle spécifique de chacune des protéines mises en jeu dans ce contexte physiologique.

Techniquement, il est possible de suivre au cours de l'embryogenèse les anomalies chromosomiques générées par une mauvaise réparation de l'ADN suite à une irradiation. Cela nécessite l'injection de colchicine chez la femelle gestante qui bloque les cellules au moment de leur division (mitose), phase pendant laquelle il est plus facile d'observer des anomalies au niveau des chromosomes. Deux heures après l'injection de colchicine, les souris gestantes préalablement irradiées (à différentes doses d'irradiation et à différents temps post-irradiation) sont euthanasiées afin de recueillir les cerveaux embryonnaires et de procéder aux analyses.

Ce projet prévoit le recours à 3840 animaux dont 1440 femelles gestantes et 2400 embryons pour une étude sur 5 ans. Les animaux sont nés et élevés dans des établissements agréés à des fins scientifiques. Des tests statistiques ont permis de calculer le nombre au minimum nécessaire pour ne pas remettre en cause les résultats escomptés. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

6659. Certaines maladies graves et souvent rares touchent l'hémostase, c'est-à-dire le processus qui permet d'interrompre les saignements et éviter une hémorragie. C'est le cas des hémophilies, toutes rares, les plus fréquentes étant les hémophiles A et B. Il n'existe pas de traitement pour toutes les hémophilies et les traitements actuels ne sont pas complètement satisfaisants. La principale mission du laboratoire est de développer et mettre sur le marché de nouvelles molécules à usage thérapeutique pour la prise en charge de telles pathologies. Dans le cadre du développement de ces molécules, l'étude de leur devenir dans l'organisme (pharmacocinétique) est indispensable. La pharmacocinétique permet entre autres de :

- Sélectionner entre différentes formulations celles qui maintiennent le médicament plus longtemps dans l'organisme ;
- Sélectionner entre différents médicaments candidats celui qui reste le plus longtemps en circulation ;

- Lors d'un changement de procédé de fabrication, s'assurer que ce changement n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique du médicament ;
- Sélectionner la meilleure voie d'administration (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale...);
- Adapter les posologies de traitement aussi bien dans les modèles d'efficacité chez l'animal que dans les essais cliniques chez l'homme.

Ces études indispensables sont réglementairement requises avant utilisation de la nouvelle molécule dans un essai clinique chez l'homme, et ne peuvent donc pas être remplacé par des études *in vitro*.

L'objectif de ce projet est d'étudier le profil pharmacocinétique de facteurs de la coagulation humains (Fibrinogène, Facteur VIIa, Facteur VIII, Facteur IX, Facteur X, Facteur XI, facteur von Willebrand, natifs ou modifiés...) après administration unique par injection (voie parentérale) dans deux modèles (lagomorphe et rongeur). La nouvelle molécule est administrée chez l'animal par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire et des prélèvements sont effectués à différents temps afin de déterminer si la molécule reste longtemps en circulation ou si elle est éliminée rapidement, quelle est sa concentration maximale, quelle est l'exposition totale de l'animal à la molécule, si la molécule reste majoritairement en circulation ou si une partie va dans les tissus, etc.

Le projet prévoit le recours à un maximum nécessaire de 3000 animaux sur 5 ans, tous nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Ils sont hébergés selon les règles en vigueur de l'animalerie avec un enrichissement de milieu obligatoire pour tous.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre, et des critères d'arrêt ont été définis et validés par une équipe vétérinaire.

6660. Les immunoglobulines polyvalentes sont des anticorps qui peuvent être purifiés à partir du plasma humain. Elles permettent de soigner un nombre important de pathologies graves telles que les déficiences immunitaires primitives ou secondaires, les maladies auto-immunes (syndrome de Guillain, maladie de Kawasaki...), de traiter des infections et de prévenir la maladie du greffon contre l'hôte, lors de greffe de moelle osseuse.

Afin de toujours améliorer la prise en charge des patients, de nouvelles immunoglobulines polyvalentes sont en cours de développement : nouvelles voies d'administration en alternative à la voie intraveineuse, concentrations plus élevées afin de réduire le temps de traitement. De nouveaux procédés de purifications sont également mis au point afin d'augmenter le rendement et d'avoir plus de molécule disponible. Dans le cadre du développement d'un nouveau médicament, des études chez l'animal sont requises pour étudier la pharmacocinétique de la molécule. Ces études permettent entre autres d'adapter les posologies de traitement et sont réglementairement requises et indispensables avant utilisation de la nouvelle molécule dans un essai clinique chez l'homme.

L'objectif de ce projet est d'étudier le profil pharmacocinétique d'immunoglobulines polyvalentes (Ig) après administration unique par injection dans un modèle non rongeur : le lapin. L'Ig est administrée chez l'animal par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire. Des prélèvements sont effectués à différents temps afin de déterminer la concentration sanguine de la molécule au cours du temps. Cette cinétique permet de déterminer si l'Ig reste longtemps en circulation ou si elle est éliminée rapidement, quelle est sa concentration maximale, quelle est l'exposition totale de l'animal à la molécule, etc... Ces expériences ne peuvent pas être menées *in vitro* ou *in silico* car seul un animal vivant possède tous les compartiments d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination des molécules.

Le protocole expérimental est adapté après revue des données existantes en interne et de la littérature pour des molécules similaires pour cette espèce. Le volume de sang récupéré par jour respecte les bonnes pratiques de prélèvement sanguin en expérimentation animale.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire afin de garantir la validité des résultats, c'est pourquoi, nous utiliserons tout au plus, 225 animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés.

Toutes les interventions sur les animaux se font sous anesthésie. A son réveil, l'animal sera observé étroitement pendant les heures qui suivent. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie. Des critères d'arrêt ont été définis et un programme d'enrichissement des cages permettront de garantir le bien-être des animaux.

6661. Dans un contexte socio-économique changeant et incertain, de remise en cause de l'élevage et de ses pratiques, il est aujourd'hui indispensable de mettre en œuvre de nouveaux modes de conduite d'élevage, valorisant mieux les ressources et minimisant l'impact environnemental. Ainsi une alimentation appropriée durant des périodes critiques de la vie de l'animal peut constituer un levier majeur pour l'obtention d'animaux plus productifs, tout en minimisant les intrants. Si la supplémentation des rations, en protéines et en lipides séparément, a déjà fait l'objet d'études, la balance entre ces deux nutriments n'a pas encore été évaluée. En utilisant une espèce modèle, la souris nous proposons d'étudier l'influence du régime maternel sur l'axe mère-petit, en analysant : 1) l'influence d'une balance protéo-lipidique (BPL) déséquilibrée dans l'alimentation sur le développement mammaire, la production et la qualité du lait et 2) l'impact du lait sur la sphère intestinale du jeune allaité. Cette étude intégrée sera conduite chez la souris, sensible aux variations de l'alimentation et permettant l'étude du développement mammaire sur un laps de temps court. Elle pourra conduire à la modulation des apports nutritionnels dans les élevages afin de favoriser le développement mammaire menant à la production d'un lait de qualité permettant d'optimiser la croissance du jeune.

Notre projet utilise une espèce modèle permettant de répondre rapidement à la problématique scientifique en étudiant 3 fenêtres nutritionnelles importantes (puberté, gestation, lactation) et de cibler l'axe glande mammaire-lait-sphère intestinale du jeune. Ce projet permettra d'obtenir, pour la première fois, une vision intégrée à court et à long terme des effets de la variation de la BPL dans

l'alimentation sur la qualité du lait et le microbiote du jeune. Ce projet requiert l'utilisation d'animaux car aucun modèle cellulaire ou *in vitro* ne peut reproduire des fonctions aussi complexes que la puberté, la gestation ou la lactation. Le schéma expérimental réalisé en collaboration avec des biostatisticiens nécessite 90 souris au total (30 par régime, réparties en lot de 10 par fenêtre physiologique étudiée) pour obtenir des résultats ayant une signification statistique.

90 souris pré-pubères, de souche C57BL/6, seront réparties en trois groupes de 30 souris qui recevront respectivement un régime : 1) à haute teneur en protéines (>50%) et faible teneur en lipides (<15%), 2) à haute teneur en lipides (>50%) et faible teneur en protéines (<15%), 3) contrôle (≈20% de lipides et ≈20% de protéines). 10 souris de chacun des 3 groupes seront euthanasiées : 1) à la puberté, 2) à mi-gestation et 3) à mi-lactation. Le suivi métabolique des animaux sera effectué par dosages sériques et urinaires. Leur développement mammaire sera apprécié par des études morphologiques pour chaque stade (puberté, gestation ou lactation). Des échantillons de lait seront collectés, sur lesquels la composition globale en protéines majeures, acides gras et hormones sera réalisée. Les souriceaux (10 portées de 6 à 8 souriceaux soit entre 60 et 80 souriceaux) allaités par les mères nourries avec chacun des régimes, seront euthanasiés en même temps que leur mère afin de pouvoir étudier leur tractus gastro-intestinal (microbiote, épithélium intestinal). Cela porte le nombre total de souris utilisées dans le projet à 170.

Les prélèvements sanguins sub-mandibulaires seront réalisés par un zootechnicien ayant une grande expérience de ces prélèvements, des analgésiques seront utilisés pour les prélèvements de lait et une attention particulière sera portée à l'enrichissement des conditions d'hébergement des animaux durant l'ensemble du protocole (papier absorbant dans les cages, cages transparentes...). Des points limites seront également définis si les animaux présentent une perte de poids, des intolérances aux régimes ou encore tout type d'inconfort ou de lésions.

6662. L'utilisation d'immunothérapies innovantes dans le domaine de l'oncologie représente un nouvel espoir pour les patients. Les résultats cliniques démontrent que la vaccination thérapeutique ainsi que les agents immunomodulateurs augmentent les chances de rémission et la survie des patients, tout en offrant des alternatives thérapeutiques prometteuses limitant les effets néfastes des chimiothérapies et radiothérapies conventionnelles. Dans ce contexte, nous développons des produits thérapeutiques basés sur la technologie des vecteurs lentiviraux, qui induisent après une injection directe dans l'organisme, une réponse immunitaire cellulaire forte et multi-spécifique contre l'antigène cible inclus dans le vecteur, ainsi qu'une réponse mémoire efficace. Dans le cadre du développement préclinique d'un nouveau traitement dirigé contre l'ATL (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma), l'efficacité doit être évaluée en utilisant un ou des modèles appropriés reproduisant le phénotype de la pathologie ; l'objectif final étant de tester le traitement chez l'homme au cours d'un essai clinique. Les études sur des modèles précliniques sont effectivement requises par la réglementation relative à la demande d'autorisation d'essai clinique (selon la directive 2010/82/01 « indications détaillées portant sur la demande présentée aux autorités compétentes en vue d'obtenir l'autorisation de procéder à l'essai clinique d'un médicament à usage humain [...] ») ainsi que par la procédure de demande d'autorisation de mise sur le marché (selon la directive 2001/83/CE « instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain »). Nous avons développé un modèle *ex vivo* en utilisant des échantillons de patients ATL qui démontre l'induction d'une réponse immunitaire cellulaire spécifique après traitement. Cependant, le profil d'expression des cellules ATL issues de patients et cultivées *in vitro* est supérieur à celui des cellules ATL présentes *in vivo* dans la circulation sanguine. Un modèle animal est donc requis pour une évaluation préclinique complète et notamment pour définir la meilleure stratégie thérapeutique pour les patients ATL. En l'absence de modèle rongeur relevant reproduisant le phénotype ATL dans un contexte immunocompétent, des babouins naturellement infectés par le virus à l'origine de la pathologie ATL et déjà disponibles vont être utilisés pour évaluer l'efficacité anti-virale du traitement après injection. L'objectif du projet est de déterminer si le traitement vaccinal et la réponse immunitaire engendrée par ce traitement suffisent à induire une destruction des cellules infectées. Le bénéfice attendu est d'anticiper si une combinaison thérapeutique est requise pour moduler l'expression virale *in vivo* et favoriser la reconnaissance des cellules ATL par le système immunitaire des patients ; afin de pouvoir optimiser leur prise en charge et la réponse clinique. L'absence de toxicité du traitement a été démontrée par des études de carcinogénicité et par des études précliniques réglementaires de toxicité, menées chez des rongeurs. Aucun effet toxique du traitement n'est donc attendu. Cependant, au démarrage de l'étude, un seul primate non humain sera injecté avec le produit et surveillé sur un période de 15 jours. Un prélèvement sanguin sera réalisé à la fin de cette période d'observation pour confirmer l'absence de toxicité du produit et l'immunogénicité. Les 9 autres primates non humains seront injectés après cette confirmation. Ils continueront tout au long de l'étude d'être hébergés selon leur condition habituelle.

6663. Les anticorps monoclonaux puis l'ingénierie moléculaire ont renouvelé la sérothérapie, multipliant les possibilités d'intervention thérapeutiques et apportant de nouveaux succès cliniques. Le premier article décrivant la génération d'un anticorps monoclonal ayant une spécificité prédéfinie a été publié dans la revue Nature en 1975 par César Milstein (1927-2002) et Georges Köhler (1946-1995) et a valu à ses deux auteurs de partager le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1984. L'exploitation de la technique d'hybridation cellulaire en immunologie dans le but d'étudier la structure des anticorps a permis à Köhler et Milstein d'immortaliser et de sélectionner une cellule hybride sécrétrice d'anticorps anti-globules rouges de mouton. Il s'agit de la technique des hybridomes. Le principe consiste à faire fusionner une cellule de rate sécrétrice d'anticorps provenant d'une souris BALB/c immunisée et une cellule murine de myélome. Les lignées myéломateuses sont sélectionnées pour leur déficit en une enzyme impliquée dans la voie de synthèse des acides aminés. Cette déficience est exploitée dans la sélection des hybridomes. C'est la stratégie la plus courante pour générer des anticorps spécifiques d'un antigène. Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés constituent la classe des principes actifs qui connaît le plus fort taux de développement actuel dans les domaines biotechnologique et pharmaceutique. En effet, ces anticorps sont des outils de recherche, des réactifs pour les tests d'analyses biologiques et des candidats potentiels à une utilisation thérapeutique.

L'objectif scientifique de ce projet consiste à générer des anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes suite à l'immunisation de souris ou de rats avec l'antigène d'intérêt. Un lot de trois souris BALB/c ou d'un rat LOU/c ou WISTAR est utilisé par programme de génération d'anticorps monoclonaux. Il est estimé qu'environ 30 programmes par an seront mis en œuvre soit l'utilisation au maximum de 90 animaux (souris et rat). Notre démarche prend en compte de réduire au maximum le nombre d'animaux par programme (3 pour les souris et 1 pour le rat) et de privilégier le confort de l'animal (anesthésie légère des animaux lors des injections et des prélèvements sanguins). Enfin, toute démarche expérimentale n'est mise en œuvre que si aucun autre modèle *in vitro* ou *in silico* n'est disponible, ce qui est souvent le cas pour les anticorps monoclonaux. Concernant le raffinement des conditions d'hébergement, tous les animaux possèdent du matériel de nidification et de protection dans leur cage. Les souris sont au minimum trois par cage, ceci afin qu'elles ne soient pas isolées car elles préfèrent vivre en groupe. Il en est de même pour les rats qui sont hébergés par 2 individus par cage. La température, l'hygrométrie et la photopériode sont contrôlées au sein de la Plateforme d'Expérimentation Animale pour répondre aux besoins des espèces hébergées.

Le succès pharmaceutique et industriel des anticorps monoclonaux s'explique par la maturité technologique qui permet de produire ces anticorps sous forme recombinante dans des cellules de mammifères. La génération d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes a permis de développer de nouveaux outils pour la recherche biomédicale. Leur utilité est déjà prouvée dans les nouvelles technologies de la génomique, de la protéomique, de l'imagerie et de la nanobiotechnologie. Malgré quelques difficultés, le potentiel des applications thérapeutiques et diagnostiques ouvre des perspectives ayant un grand impact socio-économique. Il est certain que l'acquisition de ces technologies de laboratoire est primordiale notamment pour l'industrie pharmaceutique de demain.

6664. L'hémophilie est une maladie hémorragique due au déficit d'un facteur de la coagulation. Ce déficit peut être dû à une mutation génétique ou à la présence d'anticorps contre l'un de ces facteurs. Les manifestations de la maladie sont proportionnelles au déficit et dépendent de la localisation des hémorragies. Il existe plusieurs types d'hémophilie, tous rares, selon le facteur de coagulation déficitaire : les plus fréquents sont les hémophilies A (déficience en facteur VIII) et B (déficience en facteur IX). Il n'existe pas de traitement pour tous les types d'hémophilie et les traitements actuels pour les hémophilies A et B ne sont pas complètement satisfaisants.

Il existe également d'autres troubles de la coagulation, provoqués par les nouveaux anticoagulants oraux (NAO). Les NAO sont des médicaments utilisés pour prévenir le risque thrombo-embolique (risque d'embolie pulmonaire provoquée par la migration vers une artère pulmonaire d'un caillot formé dans les veines des jambes) : les NAO ont comme effets indésirables des hémorragies spontanées ou induites par un traumatisme.

Il est donc nécessaire d'identifier, sélectionner et valider de nouvelles protéines thérapeutiques qui pourraient restaurer la coagulation dans ces situations pathologiques variées.

Une protéine qui joue un rôle crucial et central dans le contrôle de la coagulation est le facteur X activé (FXa). Elle est donc d'un grand intérêt thérapeutique.

L'objectif de ce projet est double :

- identifier des molécules dérivées du facteur Xa (obtenues par biologie moléculaire) qui pourraient inhiber l'activité anticoagulante des NAO ;
- évaluer leur efficacité à restaurer la coagulation dans l'hémophilie A et B.

La preuve de concept de l'efficacité des produits dans au moins un modèle animal pertinent est une condition réglementairement indispensable avant leur passage en développement. Ces molécules seront testées dans un modèle rongeur mis sous NAO ou chez le rongeur hémophile.

Le test est effectué chez le rongeur anesthésié pour éviter toute souffrance. En fin d'expérimentation, l'animal est euthanasié.

Le nombre de rongeur estimé dans ce projet est de 5400 rongeurs nés et élevés dans des établissements agréés. Ce nombre a été calculé de façon à tester sur des groupes de 15 animaux plusieurs paramètres sur une même molécule sur 3 ans. C'est une estimation large et il sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs pour chaque molécule testée. Des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque injection ou prélèvement afin d'éviter les souffrances. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

6665. La maladie de Parkinson est une maladie dégénérative du cerveau, elle est progressive et caractérisée par des déficits moteurs (tremblements, difficultés de mouvements) et des déficits non-moteurs (anxiété, troubles de la mémoire). Cette maladie résulte de la mort lente de certaines cellules du cerveau, les neurones, due à une accumulation toxique d'une protéine, l'alpha-synucléine. Il n'existe aucun traitement efficace et réparateur visant à rétablir les déficits liés à cette pathologie. Ceci constitue un enjeu médico-social d'importance. Nous avons établi précédemment qu'une injection unique d'alpha synucléine chez la souris est suffisante pour induire des troubles ressemblant à la maladie de Parkinson.

Ce projet consiste à établir si la maladie de Parkinson nécessite la présence d'alpha synucléine endogène, c'est à dire celle propre à l'individu, afin d'en comprendre les mécanismes responsables de l'évolution de la maladie. Pour ce faire, nous injecterons dans le striatum, partie du cerveau endommagée dans la maladie de Parkinson, soit du sérum physiologique, soit de l'alpha synucléine dans des souris C57BL6J, ayant de l'alpha synucléine endogène, et des souris C57BL6J OLA n'ayant pas d'alpha synucléine endogène. L'injection dans le cerveau se déroule en conditions aseptiques et sous anesthésie générale (raffinement). Quinze jours après la chirurgie, nous comparerons la mémoire visuelle de chaque groupe dans un test non aversif.

Nous utiliserons 4 groupes de souris de 12 individus chacun et nous y ajouterons 2 souris supplémentaires pour palier à des complications lors de la chirurgie, soit un total de 50 animaux. Le nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. L'étude des phénomènes de mémoire ne peut s'effectuer sans l'utilisation d'animaux, ces animaux doivent aussi être en bonne santé, et donc les animaux présentant des signes de stress et de souffrance seront mis à mort immédiatement. A la fin de l'expérimentation, tous les animaux seront mis à mort par une méthode réglementaire. Les structures cérébrales seront alors prélevées afin de comparer la pathologie dans les deux souches de souris.

6666. *Toxoplasma gondii* est le parasite responsable de la toxoplasmose, zoonose répandue à l'échelle mondiale et dont la prévention représente un enjeu sanitaire et vétérinaire. En France, comme ailleurs en Europe de l'ouest, les chats domestiques présents en forte densité dans les fermes sont identifiés comme étant à l'origine de la majorité de la contamination environnementale par ce parasite. Ils s'infectent en ingérant des proies contaminées et libèrent, dans les jours qui suivent leur infection, des millions d'oocystes du parasite dans leurs fèces. Ces oocystes sont à l'origine de 43% à 78% des infections humaines. La prévention de la toxoplasmose nécessite donc de caractériser le risque d'infection par les chats, ainsi que les circonstances de la contamination environnementale. L'objectif de notre étude est d'estimer l'âge moyen auquel les chats s'infectent afin de mieux prédire la contamination environnementale et de cibler les individus concernés par d'éventuelles campagnes de vaccination des chats contre la toxoplasmose. L'acquisition de ces données repose sur 8 sessions de captures-relâchés de chats de ferme identifiés individuellement. Ces captures ont pour objectif de leur prélever un peu de sang pour suivre l'évolution au cours du temps de leur statut sérologique vis-à-vis de la toxoplasmose (présence/absence d'anticorps anti-*T.gondii*). Il sera ainsi possible d'identifier les événements d'infection des chats et de tester l'effet de l'âge du chat, de son sexe, du lieu ainsi que de la saison sur la probabilité d'infection. Ces informations ne sont actuellement pas disponibles dans la littérature. Cinq exploitations agricoles ont été identifiées comme propices pour cette étude (fortes populations de chats, accord des exploitants agricoles).

L'ensemble du protocole a été conçu de manière à respecter la loi éthique des 3R. Aucune méthode alternative n'a été trouvée afin de REMPLACER le modèle animal. La procédure se base sur le suivi longitudinal de 135 chats identifiés individuellement. Ce nombre correspond à l'effectif minimal déterminé par des tests de puissance pour s'assurer de l'obtention de résultats robustes. L'objectif étant de REDUIRE au maximum le nombre d'animaux à capturer, manipuler et relâcher. Afin de RAFFINER les conditions de manipulation, les chats sont capturés sur les fermes à l'aide de chatières homologuées, appâtées et opacifiées pour les sécuriser autant que possible. Ils sont ensuite anesthésiés directement sur place afin de minimiser toute angoisse, douleur ou souffrance pouvant être générées par les interventions. Ce procédé permet de s'affranchir d'un transport et de réduire le temps de manipulation (30 minutes maximum). L'anesthésie gazeuse (Isoflurane) permet un réveil complet très rapide et un relâché de l'animal sur son lieu de vie habituel après la manipulation, dès s'être assuré de sa totale récupération. Les interventions sont conduites par deux expérimentateurs formés et aptes à surveiller et évaluer le bien-être de l'animal tout au long de la procédure et à identifier les points limites.

6667. Les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de près de 150 000 décès chaque année en France. Les artères périphériques permettent une régulation fine des débits sanguins et une perfusion optimale des tissus. La dysfonction vasculaire entraîne un défaut de perfusion des organes (cœur, cerveau, reins) liée à un problème vasomoteur (tonus excessif, dysfonction endothéliale), une rigidification (fibrose, calcification) et à des événements thrombotiques. Ces mécanismes contribuent aux complications vasculaires liées à l'hypertension, l'insuffisance cardiaque ou le diabète. La caractérisation des déterminants impliqués dans le contrôle de la réactivité et du remodelage vasculaire ainsi que de la thrombose permettrait d'envisager de nouvelles thérapies pour lutter contre les pathologies vasculaires.

Les nucléotides extracellulaires, comme l'ATP, sont des molécules libérées dans le système vasculaire en réponse à des stress mécaniques, hypoxiques ou inflammatoires. Ces molécules entraînent la constriction des artères et également des effets à plus long terme sur la prolifération et la migration cellulaire et l'agrégation des plaquettes sanguines. L'hydrolyse de l'ATP génère de l'adénosine une molécule aux nombreux effets biologiques (anti inflammatoire, dilatatrice, anti thrombotique), ainsi que du pyrophosphate, un anti calcifiant physiologique.

Ce projet vise à mettre en évidence un rôle joué par l'ATP et ces produits dérivés dans les atteintes artérielles associées notamment au Pseudoxanthome Elastique (PXE), une maladie rare, et des artériopathies connexes. Pour cela nous disposons de lignée de souris transgéniques modifiées pour les différents éléments de cette signalisation. La souris est un bon modèle pour la maladie humaine, car l'organisation de son ADN et l'expression de ses gènes sont très similaires à celles de l'homme. Même si le Remplacement intégrale de ces expériences *in vivo* n'est pas possible, des techniques *in vitro* seront utilisées au maximum. L'ensemble de ces investigations représente un total de 450 souris. Ce nombre est réduit au minimum et choisi de manière à obtenir des données exploitables en tenant compte de la dispersion des résultats. Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer une Réduction des animaux utilisés (étude statistique préalable pour limiter le nombre d'animaux par groupe) le Raffinement des techniques opératoires d'analgésie et d'euthanasie. L'environnement des animaux, particulièrement post-intervention, est enrichi. Nous placerons dans les cages des « pelotes de coton » que les souris utilisent pour se faire des nids ainsi que des tubes en carton et PVC (activité, cachette.).

Pour renforcer la pertinence des résultats, ceux-ci seront mis en regard des données obtenues par des expériences complémentaires menées sur des cellules en cultures ainsi que des échantillons humains (plasma, sérum).



6668. La qualité sanitaire des aliments est une préoccupation majeure en France et dans le monde. Dans ce cadre, il est indispensable d'évaluer le risque associé à une possible contamination de l'alimentation destinée à l'homme par des mycotoxines. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par certains champignons. Les mycotoxines sont des contaminants relativement communs des céréales et environ 25% des récoltes mondiales sont contaminées. De plus, la majorité des mycotoxines étant thermostable, elles restent présentes dans l'aliment transformé en fin de procédé.

Les symptômes toxicologiques cliniques provoqués par l'ingestion de fortes quantités de ces toxines sont bien caractérisés et vont de la mortalité, aux retards de croissance et aux troubles de la reproduction. Elles peuvent altérer les réponses immunitaires et diminuer la résistance aux maladies infectieuses de l'hôte. Elles génèrent de grosses pertes économiques pour l'éleveur et peuvent présenter un problème de santé publique.

En raison de l'altération de la réponse immunitaire par les Fusarium toxines (notamment le déoxynivalénol = DON) ainsi que de l'augmentation des lésions de l'épithélium le long du tractus digestif, plusieurs études suggèrent que les Fusarium toxines à des doses subaiguës augmenteraient la sensibilité des animaux à développer des maladies inflammatoires de l'intestin.

Le but de ce projet est donc d'étudier l'effet de l'ingestion de Fusarium toxines (DON et de son dérivé acétylé, 15-ac-DON) à des doses chroniques sur des modèles de rat mimant un SII (Syndrome de l'Intestin Irritable), suite à l'application d'un stress chronique comme le WAS (Water Avoidance Stress). En effet, il a été montré que suite à l'application d'un stress chronique de type WAS, on constatait une fragilisation de la barrière intestinale avec une augmentation la perméabilité intestinale et une modification de la composition du mucus. L'obtention d'une barrière fragilisée par le stress chronique serait alors susceptible de potentialiser les effets de l'ingestion de DON et du 15-ac-DON.

Ce projet « preuve de concept » est composé de deux études. Une première étude visera à déterminer la dose de DON et de 15-ac-DON (compatible avec celles retrouvées dans les aliments) combinée avec un stress chronique, qui entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale. Une deuxième étude utilisera cette dose de Fusarium Toxine à laquelle la perméabilité augmente, pour évaluer précisément les conséquences de ces facteurs environnementaux sur l'intégrité des 4 composantes de la barrière intestinale (immunité, microbiote, épithélium et mucus). Ce projet permet aussi de mesurer, grâce au modèle Rat, l'impact d'une population SII vulnérable (barrière fragilisée) à un contaminant alimentaire comme les Fusarium toxines.

Du fait de la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu, l'utilisation du modèle rat *in-vivo* se révèle indispensable. Ceci se justifie en outre par le nombre important d'études bibliographiques et d'outils méthodologiques utilisant ce modèle animal pour étudier les atteintes de l'épithélium intestinal par ces mycotoxines. Nous nous sommes attachés à utiliser dans chaque groupe expérimental le nombre d'animaux minimum tout en restant suffisant pour tenir compte de la variabilité inter-individuelle qui requiert d'avoir des effectifs suffisants pour les analyses statistiques. De ce fait un total de 240 animaux seront utilisés sur 3 ans pour réaliser les deux études sur les deux Fusarium toxines. Les animaux sont hébergés dans les conditions les plus adéquates pour leur assurer le meilleur environnement et les plus hauts standards de confort et bien être, dans une animalerie réglementaire et contrôlée : leur milieu de vie est notamment enrichi par des compléments de nidation et ils bénéficient d'une surveillance régulière par du personnel compétent et la présence d'une "structure du bien-être animal" au sein de l'animalerie.

6669. La myopathie de duchenne est une maladie génétique touchant environ 1 naissance sur 4000. Cette maladie entraîne une perte des fonctions musculaires, avec une atteinte de la fonction locomotrice mais également une atteinte cardiaque. Les patients développent des cardiomyopathies souvent à partir de 20 ans, qui aboutissent aux décès des patients. Il est essentiel de développer de nouveaux traitements pour traiter ces patients. Il a été montré, chez les patients et dans différents modèles pré-clinique, que la myopathie est accompagnée d'une inflammation musculaire. Notre objectif est d'utiliser des traitements immunosuppresseurs afin de réduire cette inflammation et de permettre un effet bénéfique sur les fonctions locomotrices et cardiaques. A l'heure actuelle, il existe plusieurs modèles précliniques pouvant être utilisés, cependant tous ces modèles ne présentent pas ou très peu d'atteintes cardiaques. Le modèle rat que nous utiliserons est le seul à présenter des atteintes cardiaques équivalentes à celles observées chez les patients.

Ce projet sera réalisé en adéquation avec la règle des 3R et en limitant le nombre d'animaux utilisés et la douleur chez l'animal conformément à la législation en cours.

Sur 5 ans, nous évaluons le nombre d'animaux nécessaire à 360. Lors du suivi quotidien des animaux, nous déterminerons l'état général de l'animal ; en cas de souffrance, nous administrerons un analgique et dans des cas de souffrance extrême l'animal sera sacrifié.

6670. Notre centre de recherche a pour mission de découvrir et développer des médicaments innovants pour soigner des pathologies humaines pour lesquelles l'arsenal thérapeutique actuel n'apporte pas de bénéfice thérapeutique suffisant pour les patients. Dans le cadre de cette mission, la pharmacocinétique, c'est-à-dire l'étude du devenir d'un composé dans l'organisme après son administration, est une étape indispensable et ceci quel que soit l'indication thérapeutique. Cela comprend l'étude de son absorption du site d'administration vers la circulation générale, sa distribution dans l'organisme, son élimination et son excrétion. Des modèles *in vitro* permettent d'étudier certains de ces processus et sont utilisés pour pré-sélectionner les composés les plus intéressants mais aucun ne reproduit la complexité observée *in vivo*. C'est pourquoi l'évaluation chez l'animal des propriétés pharmacocinétiques des candidats médicaments chimiques ou biologiques est nécessaire, pour sélectionner le meilleur composé pouvant être progressé dans les études cliniques chez l'homme.

Les techniques utilisées dans les procédures expérimentales de ce projet permettent de mesurer la quantité de composé dans le sang, les excréta, les organes/ tissus après son administration unique ou répétées (voie intraveineuse, orale, topique, etc...). Les prélèvements sanguins sont de faibles volumes et se font majoritairement par simple piqûre à la queue. Les volumes et fréquences

d'administration et de prélèvement sont conformes aux bonnes pratiques et toutes les techniques sont réalisées par du personnel formé et compétent. En cas d'apparition de signe clinique indésirable, des mesures sont mises en œuvre pour arrêter, minimiser ou diminuer la souffrance et/ ou détresse de l'animal. Les prélèvements d'organes/ tissus sont réalisés après euthanasie ou sous anesthésie profonde au terme de laquelle l'animal ne reprend pas conscience

Les données ainsi générées permettent de déterminer le potentiel des composés à atteindre l'organe/ tissu cible en quantité suffisante pour provoquer l'effet pharmacologique désiré. Elles aident également à sélectionner ceux qui présentent des expositions suffisantes pour pouvoir réaliser des études de toxicologie et pour lesquels un profil pharmacocinétique favorable est prédit chez l'homme. Ce projet peut également être utilisé pour des études de pharmacocinétique/ pharmacodynamique (PK/ PD) des composés. Ce type d'étude permet dans un même animal de faire le lien entre la quantité de composé présent dans l'organisme (exposition au niveau de la circulation générale, concentration au niveau du site d'action, etc...) et son efficacité avec notamment le suivi de biomarqueurs. Le nombre d'animaux utilisés est le plus faible possible en fonction des objectifs de l'étude. Dans le cadre des études pharmacocinétiques, 1 à 5 animaux par étude sont généralement utilisés. Pour les études de PK/ PD, davantage d'animaux par groupe (avec un maximum de 10) peuvent être nécessaires. Seuls des rats, souris, hamsters et gerbilles sont utilisés dans le cadre de ce projet. Ces espèces sont utilisées pour tester l'efficacité et la toxicité d'un médicament ainsi que pour la prédiction de son profil pharmacocinétique chez l'Homme. Selon notre historique, le nombre d'études réalisées est de 150 à 250 par an chez le rat et 50 à 100 chez la souris. Les hamsters et gerbilles sont utilisés de façon occasionnelle. Durant les 5 ans de ce projet, le nombre maximum d'animaux utilisés est donc estimé à 3810 animaux, soit par an 500 rats et 250 souris et sur les 5 ans du projet 30 hamsters et 30 gerbilles.

6671. Le virus du *Chikungunya* a été introduit pour la première fois dans les Antilles françaises fin 2013. S'en est suivie une épidémie quasi généralisée entraînant plusieurs centaines de milliers d'infections et la saturation des structures locales de diagnostic ne pouvant mettre en œuvre que des tests moléculaires assez complexes. La présence du virus risque fortement de se maintenir dans les Antilles. Dès lors, le développement d'un test de diagnostic rapide et peu coûteux basé sur la reconnaissance spécifique du virus par un antisérum prend tout son intérêt. Ce projet vise à produire deux types d'antisérum dans deux espèces différentes (3 animaux pour chaque espèce, lapin et chèvre) pour lesquelles les réactifs de laboratoire complémentaires sont accessibles. Les deux espèces choisies permettent également de récolter des volumes suffisants d'antisérum par rapport aux rongeurs de laboratoire. De même, *Ehrlichia ruminantium* est un pathogène majeur des ruminants en Guadeloupe et en Afrique subsaharienne. Des recherches sont développées sur ce pathogène afin de mieux comprendre le déterminisme de la virulence et, à terme, développer de nouveaux outils de lutte basés sur des tests diagnostiques ou des vaccins. Quatre protéines potentiellement impliquées dans la virulence ont été produites par ingénierie moléculaire. Au final, 4 des quatre protéines d'*Ehrlichia* seront administrées à 12 lapins (3 animaux pour chaque protéine) et une protéine de *Chikungunya* sera administrée à 3 lapins pour générer des antisérums qui seront utilisés au laboratoire pour étudier leur rôle fonctionnel au niveau moléculaire. Ultérieurement si une de ces protéines s'avérait intéressante sur le plan diagnostique, l'antisérum correspondant pourra être évalué dans un test de type ELISA.

Compte-tenu des variations individuelles dans la réponse immune, l'effectif choisi permet de tenir compte de la variabilité individuelle des réponses et aussi parer à une mortalité inattendue. La génération d'anticorps sériques ne peut s'affranchir de l'utilisation d'animaux, aucun système in vitro n'étant disponible actuellement, permettant de remplacer cette utilisation. Les immunisations des lapins n'imposent pas plus de douleur et de stress qu'une vaccination conventionnelle pratiquée en élevage. Aucune mesure spécifique de raffinement n'est à prendre dans ce cadre. Les animaux sur lesquels un gros volume de sérum devra être prélevé seront anesthésiés, puis euthanasiés.

6672. L'une des compétences du laboratoire depuis de nombreuses années est la fabrication d'anticorps polyclonaux, qui permettent la mise au point de tests rapides de diagnostic et la détection dans des domaines tels que les maladies infectieuses, la biosécurité et la biosûreté. Il s'agit par exemple de développer des dispositifs permettant la détection sur le terrain de virus émergents comme le *Chikungunya* ou le virus *Zika*. Il peut s'agir également de l'identification de bactéries pathogènes comme les *Salmonella* qui sont la cause de graves infections alimentaires et qu'il est nécessaire de détecter dans les produits alimentaires.

Les outils de détection rapide et facilement déployables sur le terrain sont nécessaires à l'Organisation Mondiale de la Santé pour limiter la diffusion des épidémies. Le manque de dispositifs de ce type (anticorps polyclonaux) a été souligné dans la dernière épidémie de maladie à virus *Ebola*. Les anticorps polyclonaux peuvent être aussi utilisés comme réactifs dans nos projets de recherche, notamment dans la réalisation de méthodes d'analyses par immunofluorescence et Western blot. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation de l'animal pour obtenir des anticorps polyclonaux, à l'échelle du laboratoire, ils sont produits par des modèles lapins.

Les animaux requis pour notre projet de recherche, au maximum 250 sur 5 ans correspondant à environ une production de 80 anticorps ; ils sont nés et élevés en captivité à des fins scientifiques dans un élevage agréé. Nous veillons à n'utiliser que le nombre minimal utile d'animaux pour assurer l'obtention des quantités d'anticorps strictement nécessaires aux applications recherchées et à la validité des expériences. Les antigènes seront injectés en présence d'adjuvant destiné à améliorer la réponse immunitaire et donc à globalement diminuer le nombre d'animaux nécessaire. Le niveau et le type de réponses immunitaires induites seront évalués pour chaque animal après prélèvement sanguin.

L'état de santé et le bien-être des animaux sont surveillés tout au long des procédures. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre les interventions appropriées. Les animaux bénéficient d'une surveillance quotidienne et d'un enrichissement du milieu avec

des cages comportant des plateformes surélevées et la mise à disposition de boules compactées de cellulose. La nourriture et la boisson sont fournies à volonté.

6673. La myélofibrose (MF) est une pathologie liée à des dysfonctionnements des cellules souches hématopoïétiques (cellules qui se différencient en cellules du sang –globules rouges et blanc, plaquettes...- tout au long de la vie). Elle se traduit par l'installation d'un état inflammatoire chronique qui induit une invasion de la moelle osseuse par du tissu fibreux, empêchant la formation normale des éléments sanguins. La MF, qui touche à peu près 400 nouveaux cas par an en France, est très invalidante et réduit considérablement l'espérance de vie des patients. Les traitements actuels sont symptomatiques et la greffe de cellules souches hématopoïétiques est actuellement la seule thérapie curative à la myélofibrose. Cependant, cette option est réservée à une minorité de patients jeunes du fait des risques élevés de morbidité et de mortalité associés à la transplantation.

Le but du projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique associé à l'activation d'une cible cellulaire, appelée PPAR $\gamma$ . Il est maintenant admis que de petites molécules synthétiques qui se fixent sur cette cible, en plus de leurs propriétés antidiabétiques, possèdent des propriétés anti-inflammatoires, anti-leucémiques et anti-fibrotiques. Ces propriétés n'ont pas été encore explorées dans le cadre de la MF. Nos expériences préliminaires sur lignée cellulaire de stroma médullaire montrent une diminution de la sécrétion de facteurs responsables de la fibrose en présence de nos petites molécules candidates. Le fait que ces modèles soient connus dans la littérature, validés par la communauté scientifique et que nos résultats *in vitro* montrent une efficacité significative, nous permet de réduire l'effectif des rongeurs nécessaires à cette expérimentation. Notre modèle rongeur peut être considéré comme un modèle préclinique qui pourra contribuer à la mise en place de nouvelles thérapies.

Notre projet porte sur une maladie complexe impliquant plusieurs interactions cellulaires et des régulations physiologiques. Il nous est donc impossible de remplacer le modèle animal par un modèle cellulaire ou par une simulation informatique. Chez le modèle rongeur, la MF peut être induite par les mêmes mutations de la cellule souche hématopoïétique que l'on retrouve chez les patients ce qui le rend particulièrement pertinent.

Les rongeurs étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire (215), en tenant compte du nombre nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Ils seront hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie. Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre. Les interventions qui pourraient engendrer de la souffrance seront réalisées sous anesthésie/analgésie. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupes permettent de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Les molécules étudiées dans le cadre de ce projet ont l'avantage d'exister sous forme de médicaments utilisés pour d'autres indications. Ces molécules, une fois validées sur les modèles animaux, pourront être testées chez l'Homme dans le cadre d'essais cliniques. Nos expériences pourraient donc participer au développement de nouveaux médicaments pour la MF, et peut-être pour d'autres cancers du sang et de la moelle osseuse.

6674. Les maladies du système nerveux (par exemple Parkinson, Alzheimer, Huntington) et les autres altérations cérébrales liées à l'âge sont une préoccupation croissante en santé publique. Ces maladies sont associées à des lésions microscopiques du cerveau et sont aussi associées à une altération précoce de la barrière hématoencéphalique. Cette dernière est une structure qui empêche la pénétration dans le cerveau de toxiques présents dans le sang.

Le combat contre ces maladies passe par la mise en place d'outils d'imagerie cérébrale qui permettront de réaliser un suivi plus précis de l'état du cerveau des patients et de modèles animaux pertinents pour caractériser les mécanismes associés à ces maladies.

L'objectif de ce projet est de valider de nouvelles méthodologies en imagerie par résonance magnétique nucléaire, technique non invasive permettant d'évaluer la qualité de la barrière hémato-encéphalique et la morphologie microscopique chez le primate.

Au-delà du bénéfice pour les projets précliniques, les nouveaux outils d'imagerie développés pourront trouver une application clinique et améliorer à terme la prise en charge des patients. Le primate non humain (PNH) est un prérequis avant l'application clinique de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies neuro-dégénératives chez l'homme.

La mise au point d'une technique d'évaluation de la qualité de la barrière hémato-encéphalique sera réalisée suite à l'administration intraveineuse d'un agent de contraste IRM disposant d'une autorisation de mise sur le marché pour l'homme. Quant à la mise au point de la technique d'imagerie microscopique, elle sera réalisée par administration du même agent de contraste par voie intrathécale ou intracérébroventriculaire qui nécessitera une chirurgie stéréotaxique. Un suivi post-chirurgical des animaux sera mené notamment avec administration d'anti-inflammatoires administrés par voie générale.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet sont nés et élevés en captivité en provenance d'élevages reconnus. Leur nombre (10) a été réduit à un minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions. Le recours au PNH est nécessaire car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles de ces cellules.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

6675. La maladie d'Alzheimer est une maladie liée au vieillissement caractérisée par l'incapacité de générer de nouveaux souvenirs. Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les

régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité du peptide bêta-amyloïde est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires) en utilisant une plateforme d'analyse préclinique *in vivo* (souris) visant à évaluer la mémoire de travail des souris en utilisant le test du labyrinthe en Y et leur mémoire spatiale à long terme avec le test de la piscine de Morris.

Afin d'optimiser l'efficacité des criblages de molécules, de réduire les risques d'échec des expérimentations chez l'animal et de diminuer le nombre d'animaux impliqués dans les études précliniques (réduction), les candidats médicaments potentiels auront été évalués préalablement sur des cultures de cellules nerveuses. Les tests comportementaux ainsi que l'étude statistique sont optimisés afin de n'utiliser que le nombre nécessaire d'animaux, amis suffisant pour obtenir des données utilisables (réduction)

- Seuls les composés ayant montré une efficacité neuroprotectrice *in vitro* sont alors testés *in vivo* (ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux impliqués dans les tests *in vivo*, si le test *in vitro* précédent n'était pas effectué). L'étude des effets de composés sur la mémoire n'est possible que sur l'animal vivant et le remplacement par d'autres méthodes n'est pas possible. Les phases précoces de la MA sont modélisées chez la souris (C57Bl/6J, lignée de souris classiquement utilisée en neurobiologie) grâce à une injection intracérébrale, effectuée dans des conditions aseptiques et sous anesthésie générale, unique de peptide bêta-amyloïde (raffinement). Les animaux sont traités par un anti-inflammatoire ayant aussi des propriétés analgésiques, avant et après la chirurgie stéréotaxique (raffinement) afin de minimiser la douleur. Ainsi après leur réveil, suivant la chirurgie, les animaux ne sont pas dissociables d'une souris normale. N'ayant pas subi de chirurgie (raffinement), ce qui est nécessaire pour tester leur mémoire, car un animal souffrant ou stressé ne peut effectuer ces tests.

L'étude des phénomènes de mémoire nécessite l'utilisation d'animaux non-stressés et en bonne santé. Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal, où qu'une inflammation due à la l'injection intracérébrale, ou au composé soit notée, l'animal sera mis à mort immédiatement. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude. Notre modèle nous permet d'obtenir des réponses rapides et très solides quant aux effets neuro-protecteurs de candidats médicaments pour le traitement et/ou la prévention de la MA. Ce projet de cinq ans nécessite 2880 souris pour le test de 40 composés en 5 ans. Les animaux exposés à ce peptide développent des troubles de la mémoire, associés à des déficits synaptiques, caractéristiques des phases précoces de la MA.

Les avantages des modèles développés (par rapport aux modèles de souris transgéniques classiquement utilisés pour ce genre de développement) sont divers : optimisation du nombre de composés à tester chez l'animal (réduction du nombre de composés potentiellement inactifs et donc d'animaux), optimisation du nombre d'animaux par groupe expérimentaux (réduction) tout en permettant d'obtenir un effet statistique.

Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de pathologies neurodégénératives liées à l'âge (dont la principale est la MA) impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapie(s) pour la MA est un des enjeux majeurs pour la communauté scientifique (publique et privée).

6676. Dans les pathologies auto-immunes (purpura thrombopénique idiopathique, syndrome de Guillain-Barré, maladie de Kawasaki, ...) et les déficits immunitaires (congénital ou acquis : myélome, lymphome, infection par le VIH), le système de défense immunitaire du malade se retourne contre son propre organisme ou n'a pas la capacité à réagir contre les agents pathogènes. Beaucoup de ces maladies sont soignées par les immunoglobulines humaines polyvalentes de type IgG, obtenues à partir de plasma humain, commercialisées depuis plus de 15 ans.

Le laboratoire est engagé dans la production/purification d'immunoglobulines humaines polyvalentes. Il doit, réglementairement, procéder à de nombreux dosages analytiques pour s'assurer de leur qualité, après purification, et garantir ainsi leur efficacité et leur tolérance chez les patients.

Une des fonctions des immunoglobulines est de reconnaître des motifs à la surface des cellules étrangères à l'hôte et d'activer les cellules humaines (globules blancs) afin de détruire ces cellules étrangères. Un de ces dosages qui permet d'évaluer cette fonction et ainsi l'efficacité des immunoglobulines fait appel à des globules rouges avec des caractéristiques spécifiques et à des globules blancs. Il est impossible d'utiliser des globules rouges d'origine humaine pour ce test en routine car l'obtention de sang frais issu d'un donneur ayant ces spécificités est très difficile. Il est donc nécessaire de recourir à une autre espèce pour collecter des globules rouges. Cette spécificité étant présente sur les globules rouges du lapin, celui-ci en tant que donneur de sang, a été privilégié pour cette étude.

Le nombre d'animaux utilisés durant le projet (3 ans) est de 3 à 6 lapins (1 à 2 par an). Le volume prélevé sur les animaux est compensé par une injection d'un volume équivalent de sérum physiologique afin d'éviter tout stress hypovolémique et un minimum de 2 semaines de repos sont prévues entre chaque prélèvement.

Ils sont nés et élevés dans des établissements agréés. Les animaux sont hébergés selon les recommandations en vigueur, dans des cages avec enrichissement de milieu.

L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

6677. Dans le cadre de la Directive Européenne 2010/63/EU (arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) les personnes utilisant des animaux à des fins scientifiques doivent acquérir les compétences nécessaires à la réalisation de leurs projets

de recherche impliquant des animaux. Pour cela, elles sont supervisées dans l'accomplissement de leurs tâches par un tuteur présentant les qualifications et l'expérience adéquate.

Dans ce cadre, nous avons mis en place, au sein de notre installation, différentes formations pratiques pour des manipulations techniques : après contention de l'animal, injections (intrapéritonéales, sous-cutanée, intramusculaires, orales), ou prélèvements (sub-mandibulaires, rétro-orbitaires, veineux).

Pour bien appréhender et maîtriser les gestes techniques demandés, l'apprentissage des expérimentateurs débutera sur des animaux en silicone. Néanmoins, pour bien maîtriser la contention associée à ces gestes techniques, il est primordial de manipuler des animaux vivants.

Ces formations seront réalisées sur des rongeurs, issus de nos élevages agréés à des fins scientifiques, qui permettent la reproduction de lignées murines nécessaires à nos travaux de recherche mais qui ne sont plus utilisés.

Un maximum de 300 animaux sera utilisé sur une période de 5 ans, ce nombre calculé pour une formation mensuelle, sera réduit au minimum nécessaire. L'application de critères d'arrêt et l'observation quotidienne des animaux nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Nous privilégions l'hébergement en groupes sociaux, dans un milieu enrichi avec des tunnels en carton et morceau de papier pour y faire un nid afin de garantir leur bien-être.

6678. La capacité à prendre une décision adaptée dans un environnement en perpétuel changement est capitale pour la survie des organismes. Cette capacité repose sur de multiples processus élémentaires qui sont largement conservés chez les mammifères. Pour cette raison, l'utilisation de rongeurs permet effectivement de disséquer chez l'animal des fonctions cognitives de haut niveau, fortement intégratives, qui, par définition, ne peuvent s'étudier qu'à l'échelle de l'organisme entier.

L'utilisation de rongeurs permet de procéder à des études fonctionnelles permettant ainsi de clarifier les bases neurobiologiques de la prise de décision, ce qui est un enjeu important non seulement en termes de recherche fondamentale, à la croisée entre des disciplines aussi variées que la neurobiologie, la psychologie expérimentale ou encore plus récemment la neuroéconomie, mais également en termes de recherche appliquée, la prise de décision étant inadaptée dans nombre de pathologies mentales comme la schizophrénie ou l'addiction. En lien direct avec cette dernière observation, les relations fonctionnelles entre diverses régions frontales et temporales sont apparues récemment comme un élément central des mécanismes de la prise de décision. Le présent projet, vise par conséquent à clarifier les bases fonctionnelles de l'architecture cortico-temporale chez le rongeur. Pour ce faire, nous procéderons à i) des études de neuroanatomie visant à la description de l'architecture des relations temporo-corticales ii) des manipulations fines, réversibles et peu invasives de certains neurones du réseau sélectionnés selon leurs projections spécifiques et nous déterminerons l'impact fonctionnel de ces manipulations dans des épreuves comportementales modélisant certains aspects spécifiques de la prise de la décision ii) des enregistrements de l'activité neuronale au sein des réseaux et sous réseaux neuronaux. Les étapes principales de réalisation de ce projet d'une durée de 4 ans nécessitent l'emploi d'un total de 960 animaux. Ce travail se base sur les meilleurs standards de la discipline pour respecter la règle des 3 R. En particulier, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons autant que possible les mêmes animaux pour plusieurs tests comportementaux. Afin de raffiner au mieux nos approches expérimentales, nous utiliserons des tests comportementaux non invasifs. Et enfin, autant que possible, nous envisagerons des approches par modélisation computationnelle afin de remplacer l'expérimentation animale.

6679. Les tests décrits dans ce projet concernent l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, définie par la Norme Européenne ISO 10993.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet ont été caractérisées de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein des laboratoires de recherche.

Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs, lapins, chiens et porcs, et ne peuvent pas être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à évaluer les éventuelles réactions biologiques au contact de matériaux et dispositifs médicaux. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à pouvoir interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests.

Nous estimons que le nombre d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 1420.

Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limite permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

6680. Les risques cardiovasculaires après une exposition chronique à des faibles doses, comme dans les cas des situations post-accidentelles, ne sont pas encore clairs ; ceci est dû à la difficulté des études épidémiologiques de mettre en évidence une corrélation directe entre les effets biologiques et la dose délivrée au corps humain. Dans ce contexte, certaines questions sont soulevées au regard des maladies cardiovasculaires : 1) Est-ce que les faibles doses de rayonnements ionisants induisent des effets sur le système cardiovasculaire ? Si oui, est-ce que cette réponse est d'ordre délétère ou non ? 2) Existe-il un seuil d'apparition des effets délétères et quel est l'effet du débit de dose ?

Les résultats expérimentaux obtenus jusqu'à présent sur l'effet de faibles doses sur les pathologies vasculaires mettent en évidence que les très faibles doses entraînent une évolution favorable de ces pathologies. L'étude des mécanismes au niveau cellulaire après irradiation chronique a été menée *in vitro*. Celle-ci pose de nombreux problèmes propres aux expérimentations *in vitro* dus notamment au vieillissement cellulaire et au débit de dose que l'on peut difficilement diminuer. L'objectif de notre étude va être d'identifier les mécanismes mis en place à faibles doses au niveau des cellules de l'arbre vasculaire par des études *ex vivo* notamment pour mieux identifier les acteurs impliqués dans la modulation de la réponse inflammatoire. L'utilisation de différentes doses et

débits de dose va permettre de répondre à la question du seuil d'apparition des effets délétères et à la présence ou non d'un effet du débit de dose.

Pour cela différents groupes de souris C57BL/6J et ApoE-/- seront irradiés à différentes doses (de très faibles doses à des doses moyennes ne causant pas d'altération de l'état général de l'animal) et débit de doses (de très faible débit à fort débit). Un prélèvement sanguin au niveau de la queue sera réalisé sur toutes les souris dans les 24h suivant l'irradiation puis lors de leur euthanasie. Ces études *ex vivo* auront pour avantage l'identification des mécanismes au niveau des cellules des vaisseaux sanguins issues directement d'animaux irradiés.

Quatre groupes d'animaux seront utilisés par expérimentation, au total il y aura 500 souris (C57BL/6J et ApoE-/-).

La conception de ce protocole répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. Le nombre de souris choisi pour ce protocole est réduit mais suffisant pour exploiter les résultats obtenus d'un point de vue statistique.

Dans le contexte du bien-être animal, le raffinement viendrait du fait que ces animaux seront anesthésiés, prélevés et mis à mort selon la réglementation en vigueur.

6681. Les recherches qui seront conduites durant les 5 années à venir auront pour objectif de mieux comprendre les mécanismes régissant la structure des réseaux sociaux chez les primates non-humains, et de développer les outils méthodologiques et d'analyse permettant l'étude de la dynamique des réseaux sociaux en relation avec les performances cognitives des individus. L'étude de cette problématique, chez l'homme, est limitée par la résolution temporelle des données réseaux, par l'impossibilité d'étudier de manière exhaustive les relations d'un groupe d'individus (ceux-ci étant toujours en contact avec d'autres individus) et enfin par la difficulté du suivi sur le long terme des performances cognitives des individus. Le protocole de recherche proposé permet de soulever ces difficultés en faisant porter à l'ensemble des individus d'un groupe de babouins un émetteur-récepteur non-invasif permettant de mesurer la proximité spatiale des individus au sein de leur groupe social. Ce protocole sera appliqué à un groupe de 23 babouins *Papio papio* dont nous connaissons les performances cognitives et qui sont hébergés dans un enclos extérieur au sein d'une plateforme de primatologie. Cette recherche apportera des informations sur la dynamique de la structure sociale des primates non humains, grâce à un enregistrement en continu et à très haute résolution de la proximité spatiale des individus et permettra de mettre en relation cette dynamique avec les performances cognitives des individus. Ce projet, destiné à mieux comprendre la dynamique des réseaux sociaux chez l'homme et l'animal, peut avoir de nombreuses applications, par exemple dans le cadre de la recherche sur la propagation d'épidémies.

Les objectifs du projet sont en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Du point de vue du remplacement, ce principe ne s'applique pas ici étant donné que nous cherchons à comprendre le comportement social du babouin en tant que tel. Du point de vue de la réduction, d'une part l'objectif est ici de comprendre la dynamique du réseau social de l'ensemble d'un groupe d'individus et d'autre part, le dispositif de récolte des données n'est pas invasif. En ce qui concerne le raffinement, nous travaillons à la mise au point de détecteurs non-invasifs extrêmement performants, de par la taille, le poids et la durée de vie. Enfin, une première étape de validation du protocole sur un sous-groupe de deux individus permettra de vérifier la bonne tolérance du dispositif ainsi que sa durée de vie en condition expérimentale.

6682. Le but de cette étude est d'établir l'influence de Slug et de VEGF sur la croissance, l'invasion et la vascularisation de xénogreffes de cancer colorectal humain HT-29. Ce modèle cellulaire sera injecté à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris Nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immunodéficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Nous suivrons la pousse tumorale au cours du temps pour évaluer l'influence de ces deux facteurs.

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

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

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 100 souris.

Type d'animaux : souris NMRI-Nude Foxn1

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

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 100 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrits 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.

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

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

6683. Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) exogène. Différentes préparations de FVIII thérapeutique existent. La production de FVIII plasmatique fait appel à des procédés extrêmement lourds pour réduire le risque infectieux, et la production de FVIII recombinant est limitée par le fait que le FVIII est l'une des protéines dont les rendements de production sont les plus faibles. De plus, la demi-vie du FVIII dans le sang ne dépasse pas 18 heures, ce qui oblige à traiter les patients au moins tous les deux jours si l'on veut empêcher le développement d'arthropathies. En conséquence, le coût de traitement d'un patient hémophile A sévère dépasse les 50 k€ par an. L'objectif de ce travail est de développer une nouvelle stratégie thérapeutique destinée à remplacer l'injection de FVIII exogène. Celle-ci repose sur l'injection d'ARNm transcrit *in vitro* (« IVT mRNA ») codant le facteur VIII. La validation et l'optimisation de cette approche seront obtenues chez la souris déficiente en FVIII, un modèle préclinique d'hémophilie A sévère.

Le nombre de souris pour chaque expérience est déterminé sur la base de prédictions statistiques de manière à être le plus bas possible. Le nombre total maximal de souris estimé pour ce projet est de 402 souris adultes et de 480 fœtus.

Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R afin de minimiser le nombre d'animaux : remplacement, réduction, raffinement.

Remplacement : Le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale *in vivo* permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques (notamment le passage trans-placentaire). Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes *in vitro* pour analyses ultérieures.

Réduction : Nous réduirons le nombre d'animaux par une analyse préalable poussée de la littérature scientifique pour maximiser les approches expérimentales. Des expériences *in vitro* seront menées en amont pour optimiser les méthodes et diminuer au maximum le nombre d'animaux par lots. Ainsi, des analyses de puissance seront-elles effectuées pour calculer le nombre minimum d'animaux par groupe tout en garantissant la solidité statistique des résultats.

Raffinement : Les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique européennes. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

6684. Les naevi congénitaux (NC) sont des tumeurs bénignes de taille variable présentes dès la naissance. Ils sont constitués d'une prolifération de mélanocytes qui infiltrent l'épiderme et le derme. Certains NC (NC de grande taille) atteignent plus de 20 cm à l'âge adulte. Outre des problèmes socio-esthétiques, le principal risque pour l'enfant est la transformation de ces lésions en mélanome. Ce risque de transformation maligne augmente avec la taille de la lésion. L'excision chirurgicale est à l'heure actuelle le seul outil thérapeutique disponible. Récemment, nous avons pu montrer qu'une mutation somatique constitutive et isolée de l'oncogène NRAS était suffisante pour induire un NC de grande taille. Nous avons également mis en évidence l'existence de cellules mélanocytaires à caractère « souche » au sein de ces tumeurs bénignes.

L'objectif de notre travail est de mieux caractériser les sous-populations cellulaires présentes au sein des NC par le biais de leur signature moléculaire. Nous étudierons plus particulièrement les voies de signalisation affectées par la mutation NRAS, et activées dans les naevocytes de NC. Ceci nous permettra ensuite de tester *in vitro* et *in vivo* (xénogreffes de tissus humains naeviques sur souris immunodéprimées) différents inhibiteurs des voies identifiées dans le but de développer un traitement médical intra-lésionnel innovant.

Type d'animaux : Souris Rag2<sup>-/-</sup>

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 90 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans.

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

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.

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

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

6685. Un ensemble de données récentes suggèrent une implication du système immunitaire, et plus particulièrement des lymphocytes T, dans la physiopathologie de diverses maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer ainsi que d'autres pathologies liées à la protéine Tau. Néanmoins, la nature et le rôle exact des cellules T impliquées restent très mal définis. L'objectif de ce projet est de mieux caractériser les réponses immunitaires impliquées dans ces maladies neurodégénératives liées à la protéine Tau. La stratégie expérimentale est basée sur des tests d'immunisation ainsi que l'utilisation d'une lignée de souris transgéniques modélisant la pathologie Tau. L'ensemble du projet consistera à : 1) étudier la capacité de la protéine Tau pathologique à activer des réponses immunitaires 2) caractériser phénotypiquement les cellules immunitaires infiltrant le cerveau des souris malades. A terme, l'ensemble de ces études devrait ouvrir de nouvelles pistes dans le développement de stratégies innovantes d'immunothérapie pour le traitement de ces maladies neurodégénératives.

Type d'animaux : Lignée de souris génétiquement modifiées modélisant la pathologie Tau sur fond C57BL/6j et souris contrôle C57BL/6j correspondantes. Nous utiliserons également des souris C57BL/6j commerciales.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 664 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : L'ensemble de ce projet vise à mieux comprendre les interactions neuro-immunes au cours des maladies neurodégénératives. Il nécessite donc l'utilisation d'un système expérimental intégré, incluant et modélisant au mieux la physiologie du système nerveux et de ses altérations, ainsi que ses interactions complexes avec le système immunitaire.

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. La stratégie expérimentale mise en place a été choisie et optimisée pour réduire au maximum le nombre d'animaux à inclure dans l'étude pour répondre aux questions scientifiques posées.

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

6686. Le retard de cicatrisation cutanée est un problème de santé publique, survenant fréquemment chez les sujets traités par les glucocorticoïdes GC (ou ayant un syndrome d'hypercorticisme comme la maladie de Cushing), et au cours de maladies chroniques comme le diabète. Etant donné que les GC peuvent activer non seulement leur propre récepteur (récepteur glucocorticoïde, GR) mais aussi le récepteur minéralocorticoïde (MR), nous avons proposé que certains des effets cutanés indésirables des GC (atrophie cutanée, retard de cicatrisation) seraient liés à leur activation excessive et anormale du MR cutané. Appliquer localement, sur la peau, un antagoniste du MR (MRA) serait alors bénéfique.

Nous avons déjà montré que l'adjonction d'un MRA limite l'atrophie cutanée cortico-induite, chez des souris, sur des explants de peau humaine en culture, et sur des volontaires sains, lors d'un essai clinique. Nous voulons maintenant tester des MRA sur le défaut de cicatrisation induit par les GC ou survenant au cours du diabète.

Notre projet consiste à utiliser des modèles murins de cicatrisation retardée, pour :

(1) comprendre les causes de cette complication et de son maintien dans le temps et (2) tester des moyens thérapeutiques permettant d'améliorer cette complication.

Type d'animaux : souris C57BL/6j commerciale

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 292 souris expérimentales pour une durée maximale de 4 ans.

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

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

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

6687. Notre groupe a développé plusieurs modèles de cicatrisation cutanée altérée, pertinents au regard de pathologies humaines. En outre, nous mettons au point des souris déficientes pour la signalisation IGF1R au niveau de plusieurs types cellulaires



épidermiques ou dermiques dans lequel tant des anomalies de l'homéostasie que de la réparation peuvent être étudiées. Dans tous ces modèles, nous évaluons la cicatrisation et le fonctionnement du cycle pileux.

L'insulinlikegrowth factor 1 (IGF1) est un régulateur majeur du développement et de l'homéostasie. Certains résultats concernant la signalisation IGF1/IGF1R sont contradictoires. Plusieurs questions restent posées : 1- l'implication de la signalisation IGF1 dans les cellules souches du follicule pileux. 2- le rôle de cette signalisation dans l'homéostasie adulte. Dans le but de l'étudier, nous avons généré deux modèles murins invalidés pour l'IGF1R inductible chez l'adulte.

Le premier modèle est une invalidation inductible d'IGF1R dans les KC sous contrôle du promoteur de la cytokératine 14 (K14) donc de l'épiderme basal et ceux de l'outerrootsheath (ORS) pileux. Le deuxième modèle est une invalidation inductible d'IGF1R dans les KC sous contrôle du promoteur de la cytokératine 15 (K15) donc dans les KC souches du follicule pileux et leur progénie pileux. L'invalidation génétique a été induite seulement après un développement harmonieux de la peau et de ses annexes épidermiques. Notre modèle K14cre IGF1RKO/KO montre une homéostasie cutanée harmonieuse sans défaut de prolifération, d'apoptose ou de différenciation à l'état basal. Notamment, nous ne retrouvons pas de diminution des cellules souches de l'épiderme interfolliculaire contrairement au modèle précédent invalidant la signalisation IGF1R pendant l'embryogenèse. Il y a par contre une réduction des cellules souches du follicule pileux indiquant l'importance de la voie IGF1/IGF. Enfin, la cicatrisation des animaux K14cre IGF1RKO/KO est fortement retardée, du fait d'un défaut de migration des KC. De plus, ces souris présentent une altération originale, pendant la phase de croissance pileux l'hypoderme montre une augmentation très importante de son épaisseur. Les souris K15cre IGF1RKO/KO ne présentent pas de défaut de l'homéostasie cutanée. Il y a une diminution des deux populations souches de l'épiderme sans altération de la cicatrisation cutanée. De manière intéressante, la phase anagène est plus longue sans défaut de la morphogenèse des tiges pileux autre qu'un défaut d'une cytokératine.

Ces deux modèles d'invalidation de la signalisation IGF1R chez l'adulte permettent pour la première fois d'identifier le rôle majeur des fonctions de la signalisation IGF1 dans l'homéostasie cutanée adulte : IGF1 ne semble pas impliqué dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes de l'adulte mais a un rôle dans la migration des KC ainsi que dans le cycle pileux. Le maintien des cellules souches épidermiques semble régulée de manière différente entre celles de l'épiderme interfolliculaire, qui semblent IGF1R indépendantes et les cellules souches du bulge qui elles en sont dépendantes.

Type d'animaux : Nous utiliserons dans le cadre de ce projet 2 modèles murins transgéniques dans deux fonds génétiques distincts (un C57BL6J et un mixte C57BL6J/129sv) :

- 1) un modèle murin avec kératinocytes de la couche basale épidermique déficients en IGF1R : Il s'agit d'un modèle d'invalidation conditionnelle de l'IGF1R dans les kératinocytes basaux (K14Cre/ESR) ;
- 2) un modèle murin avec kératinocytes du bulge du follicule pileux déficients en IGF1R : il s'agit d'un modèle d'invalidation conditionnelle de l'IGF1R dans les kératinocytes du bulge (K15Cre/ESR).

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 192 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans.

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

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

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

6688. La distribution géographique des espèces, le choix des périodes de ponte et celui de l'habitat de ponte sont intimement conditionnés par l'effet des conditions environnementales (surtout la température et la salinité) sur la survie et le développement des jeunes stades. Ces problématiques ont également un intérêt direct pour la gestion de l'environnement de l'élevage en aquaculture. A l'heure actuelle, les influences de la température et de la salinité sur les premiers stades de vie des poissons ont fait l'objet de plusieurs études, mais très peu chez les espèces tropicales ou chez des espèces euryhalines, comme *Sarotherodon melanotheron heudelotii* (Actinopterygii, Perciformes, Cichlidae), qui peut survivre en eau douce, en eau de mer et à des salinités supérieures à 3 fois celle de l'eau de mer.

L'étude sera réalisée en milieu expérimental sur des pontes spontanées de couples de géniteurs captifs marqués individuellement (puces électroniques, de type PIT-tag, applicables à des poissons de petite taille sans effet négatif). Les géniteurs sont des poissons nés en captivité, provenant d'une souche (Niayes, Sénégal), élevée dans les infrastructures d'élevage depuis plus de 15 ans. Depuis 2011, des géniteurs F2 de *S. m. heudelotii*, nés à des salinités de 0, 35 et 70, sont maintenus à ces salinités toute leur vie. Aucun changement de salinité ne sera donc opéré.

Les pontes seront récoltées peu de temps après fécondation dans la gueule du mâle incubateur. Chaque ponte subdivisée en cinq groupes exposés à 5 températures différentes (gamme 18-36°C), à la salinité de ponte. La gamme de température choisie à cette échelle expérimentale est fonction de celle rencontrée dans les environnements où l'espèce se reproduit en milieu naturel.

Pour chaque groupe, seront étudiés : a) la dynamique de survie au cours de l'incubation et de la résorption du sac vitellin et b) les variations de la taille corporelle et des dimensions du sac vitellin depuis l'éclosion (contrôles quotidiens, sur un échantillon de n=10), de manière à caractériser l'efficacité d'utilisation des réserves vitellines. Les mesures seront réalisées à partir de photographies digitales, analysées informatiquement (freeware Image J) sur des poissons anesthésiés et photographiés individuellement sous loupe binoculaire. L'innocuité du protocole d'anesthésie (eugénol), et de manipulation des poissons dans ces conditions, a été validée chez de très jeunes poissons, d'âge ou de taille comparable.

Ces opérations seront réalisées sur des pontes produites en eau de mer, en eau douce, et en eau hypersalée (70). A chaque salinité, l'étude sera réalisée sur 10 pontes de différents couples de géniteurs, de manière à tester la robustesse des réponses en fonction des parents (soit 30 pontes). 60 géniteurs seront utilisés dans ce but. 15000 œufs (500 par ponte) seront ainsi incubés dans ces conditions et amenés jusqu'à la résorption totale de la vésicule vitelline. Soit un total de 15060 animaux

6689. L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique représente un problème majeur de santé publique en France et dans le monde. A ce jour, les agents anti-plaquettaires qui préviennent la thrombose, c'est-à-dire la formation d'un agrégat notamment composé de plaquettes au niveau des coronaires, ne peuvent pas être utilisés dans le traitement de l'AVC en raison du risque de saignement élevé qu'ils entraînent au niveau du cerveau. La recherche de nouveaux médicaments antiplaquettaires prévenant la formation de thrombi plaquettaires et ayant très peu d'effets secondaires sur l'hémostase physiologique est clef pour le traitement de l'AVC. La glycoprotéine VI (GPVI) plaquettaire est considérée comme une cible intéressante pour le développement de candidats médicaments antithrombotiques potentiellement plus sûrs. En effet, le ciblage de la GPVI prévient efficacement la thrombose expérimentale chez la souris, sans prolonger son temps de saignement. D'autre part, la GPVI n'est exprimée qu'au niveau des plaquettes et des mégacaryocytes, ce qui limite le risque d'effets secondaires lors de l'utilisation d'antagonistes de GPVI. Lors d'études réalisées précédemment dans notre laboratoire, nous avons montré qu'un anticorps anti-GPVI, inhibe la thrombose expérimentale de souris humanisées pour GPVI (hGPVI) sans prolonger le temps de saignement. Cet anticorps a été humanisé. Le but de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'activité antithrombotique de cet anticorps dans un modèle murin de thrombose généralisé induit par l'injection par voie intraveineuse d'agents pro-thrombotiques (modèle bien établi dans notre laboratoire), en vue de pouvoir l'utiliser dans des essais cliniques chez l'homme.

Remplacement : Dans le cadre de cette étude, il est impossible de substituer la souris à d'autres modèles, puisque nous étudions le rôle d'un candidat médicament dans des fonctions physiopathologiques mettant en jeu des fonctions systémiques comme, le vaisseau, la pression artérielle, le flux, le sang et les cellules sanguines.

Réduction : Au cours d'études précédentes, trois doses efficaces ont été déterminées. En effet ces études ont permis de déterminer:

- 3 doses efficaces d'inhibition *ex vivo* de l'agrégation plaquettaire au collagène
- la cinétique de fixation d'ACT-017 aux doses efficaces sélectionnées sur les plaquettes
- la cinétique d'inhibition *ex vivo* de l'agrégation plaquettaire au collagène suite à l'injection d'ACT-017 aux doses efficaces sélectionnées.
- l'absence d'effet de l'ACT-017 sur l'hémostase physiologique (étude du temps de saignement après traitement avec ACT-017)

Cela permettra donc de limiter le nombre d'animaux pour les prochaines expérimentations. Le nombre d'animaux utilisés sera donc réduit au maximum, avec la contrainte d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour chaque expérience, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs (test de Mann et Whitney).

Raffinement : Un soin particulier a été apporté pour diminuer le stress et la douleur des animaux :

- Hébergement dans des cages munies de copeaux de bois et enrichie avec un carré en coton compressé afin de permettre aux animaux de réaliser un nid conformément à leurs besoins comportementaux
- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C afin lutter contre l'hypothermie.
- Après l'injection retro-orbitale, injection d'un collyre anti-inflammatoire et apaisant.
- Après expérimentation, euthanasie des souris sous anesthésie par vetflurane pour éviter toute angoisse et souffrance. Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.
- Le modèle animal de thrombose est choisi dans le but de reproduire le plus fidèlement possible cette pathologie et d'en tirer le maximum d'information. Toutes les expériences sont réalisées sur animaux anesthésiés (rompun + imalgene) et ont une durée maximale de 30 minutes.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 160 souris.

6690. La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative caractérisée par des altérations destructrices des neurones associées à des anomalies cognitives. Des données récentes supportent le rôle prépondérant des réponses immunitaires au cours de la MA, et les processus inflammatoires ont notamment été impliqués dans la progression de cette maladie. Le terme de « microbiote intestinal » désigne les quelques 100.000 milliards de micro-organismes hébergés dans le tube digestif et vivant en parfaite symbiose avec lui.

Plusieurs études suggèrent l'impact du microbiote sur les réponses immunitaires innées et adaptatives. Il a notamment été rapporté la capacité du microbiote à moduler des sous-populations lymphocytaires T conduisant à une amplification des réponses Th17, jouant un rôle pro-inflammatoire, et une diminution des cellules T régulatrices. De plus, il a récemment été démontré que le microbiote accélère la sénescence des polynucléaires neutrophiles, cellules clés des réponses immunitaires innées et inflammatoires, ce processus étant associé à l'amplification du rôle pro-inflammatoire et délétère de ces cellules. Parallèlement, une étude récente a rapporté les effets bénéfiques d'une déplétion des PN dans des modèles murins suggèrent l'impact de ces cellules au cours de la

progression de la maladie. Enfin, il a également été démontré le rôle du microbiote dans la maturation et la fonction de la microglie au sein du système nerveux central. Toutefois, aucune donnée concernant l'implication potentielle du microbiote intestinal dans la neuroinflammation et l'inflammation systémique associée à la maladie d'Alzheimer n'a été rapportée.

Les objectifs de notre projet sont donc à l'aide d'un modèle murin de pathologie amyloïde : 1) de déterminer le rôle du microbiote sur l'évolution de la maladie en évaluant son effet sur la neuroinflammation, l'inflammation systémique et les fonctions cognitives ; 2) de définir l'implication éventuelle des modulations de l'état d'activation des polynucléaires neutrophiles et des sous-populations lymphocytaires T (Th17 et Tréglutricées) induites par le microbiote sur l'effet de ce dernier dans la modulation de la symptomatologie.

Type d'animaux : Lignée de souris génétiquement modifiées modélisant la pathologie amyloïde APP PS1 sur fond C57BL/6j et souris contrôle C57BL6j correspondantes.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 144 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : L'ensemble de ce projet vise à mieux comprendre les interactions entre le microbiote et le système nerveux au cours de la maladie d'Alzheimer. Il nécessite donc l'utilisation d'un système expérimental intégré, incluant et modélisant au mieux la physiologie du système nerveux et de ses altérations, ainsi que ses interactions complexes avec le microbiote et l'inflammation systémique.

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

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

6691. Avec plus de 8.2 millions de décès recensés en 2012 (OMS, 2015) le cancer représente aujourd'hui la cause majeure de mortalité dans le monde. Malgré l'amélioration des méthodes de prévention et de traitement, la formation de métastases au cours de cette pathologie reste particulièrement problématique car elle représente la cause majeure de mortalité chez les patients. Le processus métastatique est initié lorsque les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire afin d'envahir les autres organes et d'être à l'origine des tumeurs secondaires, appelées les métastases. Les métastases se forment par un long processus faisant intervenir plusieurs étapes notamment : l'invasion des cellules tumorales, la dissémination dans la circulation sanguine ou lymphatique, l'adhérence à la paroi des vaisseaux sanguins, l'extravasation et la formation de nodules métastatiques dans plusieurs organes, notamment le poumon, le foie et la moelle osseuse. Ces nodules métastatiques croissent et forment des tumeurs secondaires. L'utilisation de modèles expérimentaux et spontanés de métastase chez la souris permet de compter les métastases pulmonaires *ex vivo* après un temps relativement court.

Outre leur rôle dans l'hémostase, les plaquettes ont été décrites pour être impliquées dans la dissémination métastatique. En effet, plusieurs études ont montré que ces dernières interviennent dans l'évasion tumorale, l'adhésion des cellules cancéreuses à la paroi vasculaire et dans la transmigration des cellules tumorales. A ce jour, les mécanismes mis en place par les plaquettes dans la dissémination métastatique ne sont pas connus.

Notre hypothèse est que les récepteurs impliqués dans l'adhérence et l'activation plaquettaire ainsi que la voie de signalisation plaquettaire pourraient favoriser l'évasion des cellules tumorales, l'adhérence à la paroi vasculaire ainsi que la transmigration tumorale entraînant la formation des métastases dans les différentes parties de l'organisme. Cette hypothèse pourra être évaluée en utilisant plusieurs lignées de souris invalidées pour les gènes codant les différents récepteurs plaquettaires ou pour des protéines de signalisation.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'importance des propriétés d'adhérence et d'activation plaquettaires dans la dissémination métastatique de divers types de cellules cancéreuses. Nous utiliserons 1080 animaux (souris, *Mus musculus*) au maximum pour cette étude.

Remplacer : L'étude du rôle des propriétés d'adhérence et d'activation plaquettaires dans l'interaction entre plaquettes et cellules tumorales sera menée en remplaçant les animaux par des expériences *in vitro* avec des plaquettes humaines et des cellules cancéreuses.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition est fixé à 20, un nombre suffisant pour appliquer à l'étude un test d'analyse de variance ANOVA. Les résultats obtenus de l'analyse par ce test statistique permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux utilisés et aussi les différents facteurs (douleur, souffrance ...) auxquels pourront être soumis les animaux (les souris).

Raffiner: Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible, la pathologie étudiée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail seront raffinées en utilisant des modèles aigües (sur 2 à 3 semaines), plutôt que des modèles génétiques qui durent plusieurs mois, afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux procédures expérimentales. Ce projet va permettre de déterminer les mécanismes moléculaires de la formation des métastases et de proposer les cibles thérapeutiques chez les patients atteints du cancer.

6692. La lithiase rénale est un enjeu de santé publique car elle affecte 10% de la population. La plupart des calculs sont oxalocalciques et dépendent en grande partie de la concentration des urines en oxalate. Il n'y a pas à l'heure actuelle de traitement diminuant l'oxalurie. D'autre part, l'intoxication à l'éthylène glycol (antigel) est classique, parfois mortelle, et se traduit par une transformation hépatique de l'éthylène glycol en oxalate qui va précipiter dans les reins sous forme d'oxalate et conduire à une insuffisance rénale aigüe.

Nous émettons l'hypothèse qu'un médicament, appelé médicament « S » (pour des raisons de confidentialité car le brevet concernant la protection contre l'intoxication à l'éthylène glycol et la lithiase est en cours) protège contre la lithiase oxalocalcique et contre l'intoxication à l'éthylène glycol. Ce médicament est donné per os à des enfants dans d'autres indications et n'a que peu d'effets secondaires.

Nous effectuerons un modèle de protection contre les calculs rénaux sur 4 mois et un modèle d'intoxication à l'éthylène glycol sur 48h.

Nos deux modèles sont optimisés selon la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). En effet, le modèle *in vivo* chez le rat est indispensable car il permet de générer des calculs rénaux qui miment les calculs humains ou de générer une intoxication à l'éthylène glycol qui ne fonctionne pas chez la souris.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir 6 animaux par groupe soit 12 animaux par procédure et 24 au total.

Si les résultats s'avéraient limites en termes de significativité, 12 animaux supplémentaires par procédure pourraient être utilisés soit un nombre maximal de 48 rats pour ce projet. Dans le cadre du raffinement, aucune intervention invasive ne sera réalisée jusqu'au sacrifice et les modèles seront optimisés.

Il est attendu que le médicament S protège contre les calculs rénaux et contre l'intoxication à l'éthylène glycol.

6693. Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament pendant son développement préclinique. Conformément à la ligne directrice " ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals; EMA/CPMP/ICH/286/1995; December 2009", la réalisation de ce projet est indispensable pour chaque nouveau candidat médicament avant de démarrer les essais cliniques chez l'homme, et avant toute autorisation de mise sur le marché. Il n'existe pas de méthode alternative *in vitro* pour ce type de procédure de traitement identique à celle utilisée chez l'homme, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant. La réglementation internationale requiert l'utilisation en recherche biomédicale d'une espèce non rongeur et rongeur. Ces projets concernent deux espèces non rongeurs, soient le chien et le miniporc. Chez ces mammifères, on évalue les effets après 1 (aigus) ou plusieurs jours de traitements dont la durée varie en fonction de celle souhaitée/possible chez l'Homme. Ce projet consiste en 2 procédures qui englobent toutes les études nécessaires au développement préclinique d'un candidat médicament chez le chien ou le miniporc (études préliminaires, subchroniques et chroniques) et leur durée varie donc de 1 jour à 52 semaines (ou plus si jugé nécessaire par les Autorités), selon la voie d'administration qui sera utilisée en clinique.

L'espèce est déterminée en fonction des homologues avec l'homme, ou des études réglementaires prévues ou déjà réalisées dans une espèce donnée. Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet varie selon le protocole expérimental et est déterminé à minima afin d'obtenir des résultats robustes et de respecter les lignes directrices en vigueur. Il est attendu d'utiliser au maximum 2420 animaux sur la durée du projet. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés en groupe dans des enclos conformes à la Directive 2010/63 avec enrichissement sauf s'il y a un seul animal par groupe ou sauf en cas d'incompatibilité sociale chez le miniporc. Les doses de produit sont choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive, néanmoins, des soins adéquats seront appliqués pour éviter l'inconfort. Les animaux sont observés quotidiennement pendant toute la durée de l'étude pour détecter tout signe de réaction au traitement ou tout signe clinique fortuit. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, musique).

6694. Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Un nombre normal de plaquettes est compris entre 150 000 et 450 000 par  $\mu\text{L}$  de sang. Au cours d'une chimiothérapie, d'un traitement par radiation, d'une infection ou suite à un accident, le taux de plaquettes circulantes peut chuter. En dessous de 30 000 plaquettes par  $\mu\text{L}$  de sang le risque d'hémorragie interne est important et peut mettre en danger la vie du patient. Afin de circonscrire ce risque une transfusion de plaquettes est souvent nécessaire.

Actuellement les plaquettes sont fournies par les donneurs de sang. L'approvisionnement en plaquettes est un des grands défis des centres de transfusion pour les années à venir. Ainsi plusieurs groupes cherchent des méthodes pour produire *in vitro* des plaquettes fonctionnelles. Pour être efficaces les plaquettes sanguines doivent rester dans la circulation sanguine le temps nécessaire à réduire les hémorragies et bien sûr être fonctionnelles c'est-à-dire capable de colmater une brèche vasculaire.

Dans cette étude, nous voulons tester la capacité des plaquettes humaines, produites *in vitro* dans notre équipe, à réduire le risque hémorragique.

Dans un premier temps, nous allons étudier la capacité des plaquettes à circuler dans un organisme vivant. Pour cela, nous utiliserons un modèle de souris immunodéficientes, tolérantes à l'administration de produits humains afin d'éviter un rejet immunologique des

plaquettes. Les plaquettes produites *in vitro* seront injectées à ces souris, la quantité de plaquettes d'origine humaine circulantes sera déterminée par cytométrie en flux dans des échantillons de sang prélevés au cours du temps. Les résultats seront comparés au taux de recirculation des plaquettes humaines prélevées chez un donneur.

Dans un deuxième temps, nous allons mesurer la capacité de ces plaquettes à raccourcir le temps de saignement de souris qui ont un risque hémorragique suite au traitement par un médicament antiagrégant plaquettaire, le clopidogrel.

Nous allons injecter ces plaquettes à des souris NSG immunodéficientes qui sont permissives à la circulation des plaquettes humaines. Avant de faire cette expérience, nous devons déterminer la quantité minimum de plaquettes à injecter à une souris pour raccourcir le temps de saignement. Cette étape sera raffinée grâce à la détermination de la quantité de plaquettes de souris nécessaire à la réduction du temps de saignement dans la souris C57BL/6. Cette valeur servira de point de départ pour déterminer la quantité de plaquette nécessaire à raccourcir le temps de saignement dans la souris NSG et ainsi limiter le nombre d'expériences à faire dans ces souris particulièrement sensibles.

Réduire : Les plaquettes humaines sont capables de circuler dans des souris NSG immunodéficientes. Nous allons utiliser ce modèle pour évaluer *in vivo*, la circulation des plaquettes humaines produites *in vitro*. Cette stratégie permet de nous affranchir de la preuve de concept que la production *in vitro* de plaquettes de souris (c'est à dire une espèce autre qu'humaine) puisse circuler dans un organisme vivant. Cette étape nécessiterait le sacrifice d'un grand nombre d'animaux afin d'obtenir des cellules souches pouvant produire ces plaquettes *in vitro* (plus de 10 souris pour la production d'un lot permettant seulement un point de test dans une souris).

Remplacer : Cette étude vise à remplacer le prélèvement de plaquettes humaines chez un donneur par une production de plaquettes *in vitro*. Les capacités hémostatiques des plaquettes produites *in vitro* sont testées dans un premier temps *in vitro* (test d'agrégation plaquettaire, caractérisation des récepteurs plaquettaire par cytométrie en flux)

Raffiner : Nous limitons l'utilisation des souris fragiles en réalisant des premières expériences dans des animaux plus résistants. D'autre part les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux sont mis à 2 ou 3 par cage afin de concilier leurs besoins sociaux et la réduction de la fréquence des changes avec le stress y afférant. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture

Les animaux immunodéficients utilisés dans ce projet sont hébergés dans des conditions stériles. Les expériences sont réalisées de manière stérile, les produits injectés sont stériles.

Ce projet nécessitera 201 souris. Les résultats seront analysés en fonction des groupes par des tests de Student ou par une analyse de variance suivie par un post test.

6695. La dégénérescence valvulaire mitrale du chien est la pathologie cardiaque la plus fréquente dans cette espèce. Elle peut affecter toutes les races canines mais les petites sont les plus concernées. Ainsi le Cavalier King Charles présente une incidence de 40% à l'âge de 4 ans, de 70% à l'âge de 7 ans et 100% des animaux sont atteints vers 11 ans en moyenne. Les mécanismes de cette sensibilité particulière de certaines races sont inconnus et les études génétiques ont échoué dans la démonstration claire d'une mutation causale. Par contre, il est maintenant clairement établi que ces animaux ont une augmentation des concentrations sanguines de sérotonine provenant d'une dégranulation anormale des plaquettes et une surexpression, au sein du tissu valvulaire mitral, de récepteurs sérotoninergiques du sous-type 5-HT<sub>2</sub>. Par ailleurs, on connaît le rôle de la stimulation de ces récepteurs dans les mécanismes d'activation des cellules de la matrice extracellulaire valvulaire. En effet, c'est l'activation chronique du récepteur 5-HT<sub>2B</sub> par la nordexfenfluramine, métabolite actif du benfluorex Médiator\*, qui est à l'origine des valvulopathies médicamenteuses dues à ce médicament. L'objectif général du projet de recherche est d'évaluer, pour la médecine vétérinaire, trois biomédicaments nouveaux et développés pour bloquer des médiateurs agissant comme des co-activateurs de la voie sérotoninergique comme protecteurs des valves cardiaques chez des chiens ayant une valvulopathie mitrale débutante détectée par l'examen clinique et/ou l'échocardiographie. Dans le présent projet, nous évaluerons les effets de 3 nouveaux biomédicaments.

Le présent projet vise à montrer l'efficacité de molécules qui seront ensuite évaluées en essai clinique chez le chien. Nous souhaitons tester les 3 produits dans un modèle de valvulopathie induite chez la souris par l'administration chronique de nordexfenfluramine. Ce modèle est parfaitement établi et doit permettre ici d'évaluer le potentiel préventif de ces molécules. Il constitue la dernière étape pharmacodynamique avant de pouvoir mener des études toxicologiques et cliniques d'efficacité.

Dans le cadre du respect des bonnes pratiques de laboratoire relatives à l'expérimentation animale, la règle des 3R se décline pour le présent projet de la manière suivante :

Nos protocoles sont standardisés et plusieurs précautions sont prises pour le suivi de nos animaux. Ainsi, une surveillance quotidienne est réalisée par du personnel qualifié, les zootechniciens de la plateforme de l'animalerie ainsi que par la technicienne du laboratoire. Nos animaux sont hébergés à l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine dans des cages réglementaires de type II (14cm de hauteur et 370cm<sup>2</sup> de surface) sans dépasser 4 souris par cage (poids des animaux aux alentours de 28g). En ce qui concerne l'enrichissement du milieu, nous utilisons des tunnels en carton et des bâtons type « aspen bricks » à ronger.

Nous avons réduit le nombre d'animaux sur cette étude, nous allons réaliser ici 10 animaux par groupe (50 souris au total) pour nous assurer d'avoir 8 souris dans chaque groupe en fin de protocole ce qui sera suffisant au vu du nombre de groupes (5) pour réaliser des analyses de variance sur valeurs quantitatives.

A l'heure actuelle, le type d'approche développée dans cette étude ne peut, du fait de la complexité des systèmes biologiques intégrés qu'elle met en œuvre, être modélisée par des méthodes *in vitro*.

6696. Le but de notre étude est d'évaluer l'activité tumorigène de la famille des interleukines 17 dans les mélanomes, les fibrosarcomes, et les cancers mammaires, colorectaux et pancréatiques. Les interleukines sont des cytokines autrement dit des

facteurs solubles présents dans chaque organisme. Les interleukines sont produites mais aussi utilisées par le système immunitaire. Elles servent de messagers entre les cellules du système immunitaire, notamment de médiateur dans les interactions locales entre les leucocytes (globules blancs).

La famille des interleukines 17 (IL-17) est composée de six membres : IL-17A (ou IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E et IL-17F. Les cytokines les mieux caractérisées de cette famille sont les IL-17A et IL-17F pour lesquelles il a été rapporté un rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires, mais également dans le développement tumoral.

Dans le cadre d'un projet collaboratif, nous disposons de cinq anticorps murins dirigés contre les cytokines IL-17. Après avoir validé l'activité neutralisante de ces anticorps *in vitro*, il s'agit de tester la possibilité de limiter le potentiel tumorigène de ces cytokines en neutralisant leurs activités par le biais de ces anticorps *in vivo*.

L'objectif de ce projet est donc :

- de caractériser et de valider l'utilisation des anticorps anti-IL-17 comme candidats pour l'immunothérapie anti-tumorale par neutralisation de ces cytokines.

Les souris seront surveillées quotidiennement ceci dans le but de :

- suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 20% du poids normal de l'animal
- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction). Pour une première expérience le nombre de souris par groupe est fixé à 8 puis il est réduit à 6 pour une reproduction d'expérience.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre maximal de 882 souris sur une durée de 3 ans.

6697. Le cancer du sein est une cause importante de mortalité dans le monde. La progression des tumeurs mammaires est caractérisée par des étapes pathologiques et cliniques distinctes : hyperplasie ductale, évolution vers un carcinome *in situ* puis invasif et, finalement, dissémination des cellules tumorales à des sites métastatiques distants. Les phénotypes invasifs et métastatiques sont des processus mal compris alors qu'ils ont un impact majeur sur la prise en charge et survie des patients. Il est donc nécessaire d'élucider les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'invasion et la métastase afin d'identifier de nouvelles options thérapeutiques. C'est dans ce contexte que nous avons été les premiers à montrer que les facteurs de transcription NFAT sont exprimés dans des tissus de patients atteints de cancer du sein et qu'ils participent à la régulation de la capacité invasive des carcinomes mammaires à la base de la progression métastatique. De plus récemment la voie de signalisation NFAT, qui joue un rôle critique dans le développement des vertébrés, a été impliquée dans la progression de plusieurs cancers. Pour ces raisons, une dissection précise de son rôle dans la progression de ces pathologies est maintenant devenue essentielle. Notre travail récent a permis de montrer pour la première fois qu'un isotype de la famille NFAT, NFAT3, exprimé dans des carcinomes mammaires peu invasifs, est un facteur anti-invasif au contraire de NFAT1 et NFAT5.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les rôles opposés des protéines NFAT1, NFAT5 et NFAT3 dans les mécanismes de formation des métastases. Les protéines NFAT jouent en effet un rôle clé dans la formation des métastases, car elles régulent la capacité des cellules cancéreuses à se déplacer dans l'organisme et ainsi à coloniser des organes distants du sein pour former des tumeurs secondaires. Selon la protéine NFAT impliquée, les effets peuvent être complètement opposés. Ainsi, l'équipe du docteur Jauliac a montré que dans des cellules de cancer du sein, les protéines NFAT1 et NFAT5 favorisent la migration, alors que NFAT3 la bloque. Ce projet présente un enjeu majeur et l'espoir de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques en augmentant ou bloquant l'effet des protéines NFAT. Ces travaux devraient être utiles également pour d'autres types de cancers.

Les objectifs du projet sont : 1) de confirmer *in vivo* le rôle des facteurs NFAT1, NFAT5, NFAT3 dans la tumorigénèse mammaire. 2) de valider et de comprendre les liens avec les gènes cibles de NFAT et leurs cofacteurs. Pour cela, des souris femelles immunodéficientes âgées de 6-8 semaines seront utilisées. Les souris NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Hr<sup>hr</sup>/NCrHsd de chez Harlan et les souris Hsd:ATHymic Nude-Foxn1nu de chez Harlan. 2 lignées humaines (D3H2LN et MCF7-F5) du cancer du sein exprimant la luciférase et surexprimant ou sous-exprimant les différents NFAT et/ou leurs gènes cibles et/ou cofacteurs seront injectées en « Fat-Pad » dans ces souris immunodéficientes. Ces souris seront surveillées quotidiennement ceci dans le but de : 1) suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 10% du poids normal de l'animal, 2) l'apparition de métastase par imaging luminescent 3) détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement). Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction).

Dans ce projet, un nombre total final de 520 souris réparties en 52 groupes expérimentaux seront utilisées.

6698. La sclérodémie systémique (ScS) est une maladie auto-immune caractérisée par une fibrose touchant la peau et les organes internes et une atteinte des vaisseaux touchant la microcirculation (microangiopathie) évoluant vers une occlusion vasculaire et qui se manifeste cliniquement par le syndrome de Raynaud et dans les formes graves par une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Les patients atteints de ScS ont un risque de décès multiplié par 3,5 par rapport à une population saine appariée. La fibrose pulmonaire et l'HTAP constituent les deux causes principales de décès dans cette maladie.

Malgré les progrès récents dans les connaissances physiopathologiques de la maladie, il n'existe pas de traitement permettant de traiter efficacement les complications vasculaires et la fibrose liées à la ScS. Les travaux préliminaires de notre équipe ont identifié 3 cibles principales dans cette maladie et l'intérêt de ces cibles dans la ScS a été conforté par des expérimentations préliminaires *in vitro* : la première est impliquée dans l'auto-immunité, la seconde dans le remodelage de la matrice extracellulaire et la troisième dans la régulation de l'activation des fibroblastes.

Notre objectif est d'étudier *in vivo* le rôle de ces cibles dans un modèle murin original de ScS, la souris transgénique pour le facteur de transcription fra-2, seul modèle reproduisant les atteintes sévères de la ScS que sont la fibrose pulmonaire et l'HTAP, avec une séquence temporelle identique à celle de la maladie humaine. Il n'existe pas d'autre alternative préclinique d'évaluation de molécules prometteuses dans la ScS.

160 souris seront nécessaires à cette étude (80 souris transgéniques pour Fra-2 et 80 souris contrôles de même fond génétique C57/BL6 non transgéniques pour Fra-2). Les animaux recevront les traitements par voie orale ou par injection et après 4 semaines de traitement, les souris seront évaluées sur le plan pulmonaire (scanner pulmonaire) avant d'être sacrifiées pour analyse histologique. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. L'utilisation d'un seul modèle regroupant les différentes atteintes de la maladie est un atout majeur permettant de diminuer le nombre d'animaux utilisés, évitant d'utiliser des modèles murins différents pour chacune des atteintes.

Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum permettant des comparaisons statistiques cohérentes.

Le scanner pulmonaire sera réalisé sous anesthésie à l'isoflurane 3% afin de limiter l'angoisse infligée aux souris.

Une stratégie d'observation quotidienne sera mise en place afin d'évaluer la douleur, la souffrance, et l'angoisse. La présence d'au moins un point limite de grade 1 (perte de poids entre 10 et 25%, isolement, altération de la réponse aux stimuli, poils hérissés) conduira à l'arrêt de l'expérimentation sur l'animal et à sa surveillance. Un antalgique sera prescrit en cas de symptôme douloureux. La présence d'au moins un point limite de grade 2 (perte de poids >25%, mutilation, absence de réponse aux stimuli, souillures, atrophie de la musculature dorsale) conduira à l'arrêt de l'expérimentation sur l'animal et à l'euthanasie par dislocation cervicale. L'observation de points limite de grade 2 chez 20% des animaux, conduira à l'arrêt du projet.

Ce travail devrait permettre de mieux préciser la physiopathologie de la ScS et en particulier de ses atteintes sévères, avec pour objectif de développer des traitements efficaces.

6699. La démence fronto-temporale, est une maladie neurodégénérative, caractérisée par la mort progressive des cellules de la partie frontale du cerveau. Cette mort progressive est liée à la défaillance d'une protéine contenue dans le cerveau : la protéine Tau. Les patients atteints de cette maladie souffrent de problèmes de mémoire spécifique au raisonnement et la planification et de déficit dans leur comportement social. Ce projet vise à modéliser cette maladie chez la souris car il n'existe pas de possibilité de remplacement pour l'étude du comportement et d'évaluer la progression des déficits comportementaux.

Pour ce faire, nous injecterons (3 doses différentes) de protéine Tau modifiée, dans la partie frontale du cerveau. Cette chirurgie est effectuée par du personnel compétent, dans des conditions aseptiques, et sous anesthésie générale (raffinement). De plus les animaux suivent un traitement anti inflammatoire et analgésique avant et après la procédure (raffinement). Ainsi, après leur réveil, suivant la chirurgie les animaux ne souffrent pas et ne sont pas dissociables d'une souris normale, n'ayant pas subi de chirurgie, ce qui est nécessaire pour tester leur mémoire, car un animal souffrant ou stressé ne peut effectuer ces tests. Après un temps de récupération, les animaux seront soumis à deux tests comportementaux visant à évaluer leur capacité de mémoire et leur comportement social. Afin de réduire le nombre d'animaux, mais de toujours pouvoir évaluer la progression des déficits comportementaux, nous utiliserons les mêmes animaux à 15, 30 et 60 jours après l'injection cérébrale (réduction).

Le test visant à évaluer le comportement social est un test couramment utilisé dans la recherche, et consiste à placer un animal dans une enceinte contenant une autre souris (elle-même placée dans une petite cage). Le nombre et la durée des interactions sociales entre les deux souris sont mesurés pendant une période de 5 minutes.

Le test visant à évaluer la mémoire nécessite la restriction alimentaire de l'animal pendant deux jours afin de motiver l'animal à effectuer ce test. L'animal recevra assez de nourriture pour que son poids se maintienne à 85% de son poids de départ. Le test consiste à placer l'animal dans une boîte contenant deux compartiments un de couleur blanche et ouvert, l'autre de couleur noire et fermé. La souris est placée dans le compartiment blanc et apprend à rejoindre le compartiment noir par un tunnel reliant les deux. Le compartiment noir contient des friandises. Après trois essais l'animal aura appris à rejoindre le compartiment contenant les friandises. Le lendemain l'animal est placé dans le compartiment blanc et doit effectuer la même tâche. Cependant le tunnel reliant les deux compartiments a été obstrué par une bourre de coton, obligeant l'animal à effectuer une action (retirer le coton) afin d'arriver à son but (rejoindre le compartiment contenant les friandises). Ce qui constitue une planification. L'animal sera soumis à 3 essais de 180 seconds maximums. Le temps que l'animal met à entrer dans le compartiment noir sera mesuré et reflète ses capacités de raisonnement.

Nous utiliserons 48 souris (3 doses de protéine Tau et un groupe contrôle injectés avec du sérum physiologique) C57BL6J mâles, couramment utilisés dans la recherche sur le cerveau, auxquelles nous ajouterons 3 souris afin de palier à des problèmes lors de la chirurgie. Soit un total de 51 souris. Ceci permettant l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux (réduction) mais aussi de permettre d'utiliser les résultats même si un animal par groupe devait à manquer. Tous les animaux seront mis à mort 61 jours après le dernier test comportemental, les cerveaux seront prélevés afin de mesurer différents paramètres des cellules du cerveau et ainsi de les comparer avec la pathologie humaine.

6700. L'obésité est liée à un déséquilibre entre apport nutritionnel et dépenses énergétiques. Ce déséquilibre entraîne de nombreuses complications dont le diabète de type 2 (DT2). Le tissu adipeux est considéré comme l'un des acteurs principaux des complications observées. En effet, le tissu adipeux des sujets obèses contient un grand nombre de cellules immunitaires à l'origine des complications métaboliques induisant entre autres le DT2. Parmi ces cellules immunitaires, les lymphocytes T de type 17 (Th17) sont retrouvés dans le tissu adipeux de sujets obèses, mais pas de sujets minces. Des travaux récents démontrent que les cellules souches adipocytaires (CSA) du tissu adipeux du sujet obèse induisent les cellules Th17 et que l'interaction entre ces cellules induit

une insulino-résistance au niveau des adipocytes. Sur la base de ces observations, il apparaît possible que le blocage de l'interaction entre les CSA et les Th17 pourrait prévenir l'inflammation du tissu adipeux et donc l'insulino-résistance, une des caractéristiques du DT2. Des travaux *in vitro* démontrent que la molécule DNER (Delta/Notch like EGF related receptor) qui est exprimée par les CSA agit sur le récepteur Notch1/2 (porté par les lymphocytes T). Nous souhaitons confirmer ces données obtenues *in-vitro*, dans des modèles expérimentaux murins permettant l'invalidation de la molécule DNER dans l'intégralité de l'organisme ou spécifiquement dans le tissu adipeux.

Nos travaux viseront plus particulièrement à étudier les conséquences de l'invalidation systémique ou tissu-adipeux-spécifique de la molécule DNER dans un modèle murin en régime normo-calorique ou exposé à un régime alimentaire riche en lipides et en sucres (HFHS). Ces travaux devraient donc permettre de clarifier si le blocage de l'interaction de DNER avec Notch1/2 présente un intérêt thérapeutique pour inhiber la capacité des CSA à activer l'inflammation chronique, l'insulino-résistance, et le DT2.

Afin de nous conformer à la règle des 3Rs (Remplacement, Réduction et Raffinement), le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. En raison de la nature complexe de ces recherches, qui visent à comprendre les réponses physiologiques au sein de différents organes, nous ne pouvons malheureusement pas remplacer l'utilisation de modèles murins par des outils cellulaires ou des approches *in vitro*. Signalons que d'après les données de la littérature, les souris invalidées pour la molécule DNER ne présentent pas de phénotype dommageable ni de signes de souffrance. Néanmoins nous avons mis en place une surveillance adaptée et individuelle des constantes métaboliques des animaux en cours d'expérience afin d'assurer leur suivi et l'obtention d'un maximum d'informations sur chacune des souris analysées. Cette approche devrait donc nous permettre de fortement réduire le nombre d'animaux utilisés, d'éviter leur souffrance et de limiter la répétition de nos expériences. Nous prévoyons l'utilisation d'un maximum de 300 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre de souris nous permettra de tester si le blocage de l'action de la molécule DNER présente un intérêt thérapeutique qui pourrait être proposé chez les patients souffrant d'obésité et de diabète associé.

6701. Le projet d'une durée de 5 ans est un projet de recherche fondamentale avec des aspects translationnels, vers la clinique humaine. Le type d'animal utilisé sera la souris.

L'estimation de nombre d'animaux impliqués est de 1100.

L'objectif du projet est de connaître les effets sur la spermatogenèse de cinq défauts génétiques identifiés chez des hommes infertiles avec une très forte diminution dans la production de spermatozoïdes. Ce problème est très fréquent, avec 1 homme sur 100 estimé concerné. La moitié de ces hommes bénéficie de la Procréation Médicalement Assistée (PMA) pour concevoir un enfant avec leurs propres spermatozoïdes. Néanmoins, dans tous ces cas, on ne sait pas pourquoi la spermatogenèse va mal et quelles sont les conséquences sur la qualité des spermatozoïdes. Il est très difficile d'étudier ces aspects chez l'homme, car les biopsies testiculaires ne sont que prélevées dans une minorité de cas, et cela 10-15 ans après le début de la spermatogenèse à la puberté.

Les avantages et avancées principaux de notre projet seront :

- 1) la confirmation ou infirmation qu'un variant génétique chez l'homme est une cause d'infertilité.
- 2) une description précise de la spermatogenèse défectueuse, informant la prise en charges des couples infertiles – ex. prévoir l'absence de spermatozoïdes testiculaires évite des biopsies inutiles.
- 3) une meilleure compréhension des processus qui constituent la spermatogenèse.
- 4) une évaluation des risques liés à la qualité du matériel génétique transmis à l'enfant conçu par PMA.
- 5) la définition du rôle des gènes étudiés dans la fertilité masculine et féminine.

Les effets dommageables de notre projet sur les animaux seront légers. Le projet a deux volets : les croisements pour générer les animaux porteurs des variantes génétiques à étudier, et l'euthanasie pour étudier ensuite les organes reproducteurs mâles et femelles. Il y aura une souffrance légère liée au prélèvement de 2 mm de l'extrémité de la queue afin de déterminer si une souris porte 0, 1 ou 2 copies de la variant génétique. Ceci est inévitable car, lors des croisements, différents types de souris sont présents dans les portées. Par contre, une souffrance liée au défaut génétique étudié n'est pas attendu puisque chez l'homme les mêmes défauts génétiques ne perturbent que la fertilité. Si toutefois les souris porteuses d'un variant génétique manifeste des signes de souffrance liées au variant elles seront directement mises à mort et l'étude du variant concerné ne sera pas poursuivi.

Conformité avec les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement :

Remplacement – Le modèle animal est indispensable à ce projet de recherche. La spermatogenèse est un processus complexe où des cellules qui deviendront des spermatozoïdes se développent en contact étroit avec d'autres cellules nourricières. Il n'existe pas actuellement un système alternatif capable de reproduire la spermatogenèse hors l'animal. D'ailleurs un modèle animal permet de suivre la mise en place de la spermatogenèse pathologique associée à un défaut génétique, ce qui est impossible chez l'homme où l'homme infertile ne se présente dans un centre de PMA que 10-15 ans après la puberté. Donc chez l'homme, même avec une biopsie testiculaire, il est impossible de discriminer un blocage ou un défaut primaire des effets secondaires qui pourraient en découler.

Réduction – Le nombre de souris minimum a été estimé sur la base que 4 souris de chaque type qui seront nécessaires pour obtenir un résultat significatif à chaque âge de souris étudié. La possibilité que, selon le variant génétique, la caractérisation des souris doit se faire à trois âges différentes a été prise en compte.

Raffinement – La souris est un bon modèle pour l'étude de la spermatogenèse chez l'homme pour plusieurs raisons. La souris est un mammifère qui montre une grande similitude à l'homme au niveau de son génome et de son développement, incluant la spermatogenèse. Pendant des décennies, la souris a été, et reste le modèle de choix pour les études de la biologie chez les mammifères, et par conséquent, il y a un ensemble de données disponibles très riche. De plus sa petite taille et son temps de génération court (3 mois) fait de la souris un modèle abordable et pratique. Pour réduire le stress, les souris seront au moins deux par cage, et il y aura un abri opaque pour enrichir leur environnement. Pour prévenir la douleur, les souris seront surveillées au moins trois fois par semaine en plus du contrôle classique quotidien, et les souris montrant des signes de souffrance au niveau



comportemental (ex. léthargie, mise en boule) ou physique (ex. perte de poids, ralentissement de croissance, tumeur) seront euthanasiées immédiatement (mise en place de points limites).

6702. Les améliorations des stratégies thérapeutiques modernes au cours des dernières années ont permis d'augmenter considérablement les chances de survie des patients atteints de leucémies. Cependant 20-30% des patients présentent des leucémies résistantes aux thérapies actuelles ou rechutent après la première ligne de traitement. Il apparaît donc crucial d'identifier les aspects moléculaires et fonctionnels impliqués dans l'évolution clonale et la progression leucémique en utilisant les modèles que nous avons précédemment décrits pour les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) et la maladie de Fanconi ainsi que des animaux génétiquement modifiés représentant des modèles prototypiques des pathologies humaines que nous étudions. Au terme de notre projet, les résultats obtenus, entre autres avec les xéno greffes de LAL-T humaines associées à des essais précliniques pour la validation de nouvelles drogues, devraient contribuer à l'amélioration des traitements proposés aux patients.

Notre projet s'articule autour de 4 axes principaux :

L'objectif 1 consiste à modéliser *in vivo* la progression leucémique afin de valider fonctionnellement les voies de signalisation oncogéniques identifiées par une approche génomique à large échelle dans des échantillons de patients.

L'objectif 2 consiste à modéliser la progression tumorale dans les souris transgéniques *Tal1/Lmo1* et *Fancg<sup>-/-</sup>Trp53<sup>-/-</sup>*, qui représentent des modèles prototypiques d'hémopathies humaines.

L'objectif 3 consiste à modéliser la prise de greffe de cellules hématopoïétiques dans un modèle de souris humanisées pour l'anémie de Fanconi.

L'objectif 4 consiste à développer un modèle préclinique afin de tester de nouvelles drogues susceptibles d'améliorer les stratégies thérapeutiques futures.

Afin de répondre aux différentes questions adressées, nous appliquerons le principe de la « règle des 3R ». Nous réaliserons le plus possible d'expériences avec des modèles *in vitro*, seules les expériences absolument indispensables seront réalisées *in vivo* en optimisant au maximum la méthodologie employée en fonction des résultats obtenus par les approches *in vitro*.

Quels que soient les objectifs à atteindre, pour les expériences *in vivo*, nous utiliserons des lots de 12 souris afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour conclure à partir des résultats obtenus. Par ailleurs, nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 4000 souris. De plus, tous les animaux utilisés pour répondre aux différents objectifs seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur afin d'éviter toute douleur, souffrance et angoisse inutiles et nous aurons recours autant que possible à des techniques d'imageries non invasives pour le suivi rapproché des animaux afin de privilégier leur bien-être.

6703. En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, cette pathologie provoque environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales qui ont acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme et prolifèrent indéfiniment pour former une tumeur maligne et/ou des métastases.

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

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests *in vitro* sont systématiquement mis en place sur des modèles cellulaires humains reconstruits, mimant artificiellement la pathologie de l'homme.

Grâce à ces tests *in vitro*, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles *in vivo* de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. C'est en effet dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse.

Pour pouvoir effectuer ces évaluations *in vivo*, il est indispensable d'utiliser en premier lieu un modèle tumoral maîtrisé et bien caractérisé en recréant la pathologie par implantation de cellules tumorales ou de fragments tumoraux chez la souris. L'animal porteur de tumeur devient ainsi un bon modèle expérimental pour évaluer les composés anti-cancéreux.

Ce projet va ainsi consister à déterminer les conditions optimales de greffe pour induire correctement les tumeurs et disposer de modèles fiables et robustes utilisables pour la sélection de candidats médicaments. Dans ce projet les souris sont immunocompétentes, c'est-à-dire que leur système immunitaire est parfaitement fonctionnel. En effet, certains traitements anti-cancéreux, comme l'immunothérapie ou la thérapie ciblée, nécessitent parfois le recours au système immunitaire pour être actifs et efficaces. Il n'est donc pas possible, dans ce cas précis, d'étudier ces composés sur des souris immunodéficientes porteuses de tumeurs humaines comme c'est le cas la plupart du temps.

Une pré-sélection des conditions expérimentales à tester est réalisée avant le démarrage des études par une phase préalable de recherche bibliographique pour chacune des lignées tumorales à étudier. Sur la base de ces informations, différentes concentrations cellulaires de cellules tumorales murines ou de fragments tumoraux murins sont injectées en voie sous-cutanée, intradermique ou en intra-mammaire à des souris et la croissance tumorale est ensuite suivie au cours du temps.

Deux techniques d'évaluation de la croissance tumorale peuvent alors être employées : par pied à coulisse ou par imagerie optique. Ces 2 techniques, non invasives pour l'animal, présentent chacune leurs avantages et inconvénients et seront choisies en fonction des besoins expérimentaux. Le pied à coulisse permet par exemple une mesure rapide sur animal vigile alors que la bioluminescence nécessite une anesthésie de la souris pendant la durée d'acquisition des données, mais permet une détection plus précoce des tumeurs ainsi qu'une détection de la prolifération métastatique pour certains types de tumeurs.

L'état général des souris est surveillé régulièrement et les volumes tumoraux sont mesurés au moins 2 à 3 fois/semaine, à la fois pour l'objectif de l'étude mais également pour identifier les éventuels signes de souffrance et appliquer les points limites prédéfinis si nécessaire. Tout au long de l'étude, les souris sont logées en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de « cocoon », est apporté de manière à favoriser leur instinct de nidification.

Ces études vont permettre de déterminer les meilleures conditions de greffe sur la base des nombreux paramètres qui vont pouvoir être recueillis comme la vitesse de croissance tumorale, le pourcentage de prise tumorale, l'absence de nécrose et de perte de poids, mais également le relevé des signes cliniques. Cette étape est également primordiale puisqu'elle va permettre d'adapter en conséquence le nombre de souris à greffer pour les études pharmacologiques mais également d'assurer la réussite de la greffe.

Compte tenu du nombre de lignées tumorales pouvant être étudiées sur 5 ans, on estime à 2100 le nombre de souris nécessaire pour ce projet.

6704. La cardiologie prend en charge les troubles du rythme et de conduction cardiaque qui entraînent des malaises, syncopes, palpitations et mort subites.

Le diagnostic de ces troubles du rythme et de conduction fait appel notamment à des explorations invasives (électrocardiogrammes internes par des sondes introduites par voie vasculaire permettant de faire des enregistrements au contact des structures cardiaques). Elles peuvent donner la localisation précise et les causes d'un ralentissement temporaire ou permanent de la fréquence cardiaque (bradycardie) ou d'une accélération de la fréquence cardiaque (tachycardie).

Ces explorations permettent également de guider la thérapeutique : quand le cœur est lent on envisage une stimulation cardiaque définitive (pace maker), en cas de tachycardie on peut cautériser les zones responsables du trouble du rythme ou envisager la mise en place d'un défibrillateur si le trouble du rythme met en jeu le pronostic vital.

La formation à ces techniques d'électrophysiologie et de stimulation cardiaque (2 ans) est sanctionnée par un examen théorique de diplôme interuniversitaire (DIU). La formation pratique (manipulation des cathéters et des sondes intra cardiaques) passe par l'utilisation de simulateurs et par l'enseignement en salle d'exploration et d'implantation sur les patients.

Actuellement, nous n'avons pas la possibilité matérielle et temporelle de réaliser de façon efficace et rapide l'enseignement des internes en particulier au début de la formation pratique (début de la courbe d'apprentissage), d'où la nécessité d'envisager un enseignement pratique avant le compagnonnage en salle d'électrophysiologie interventionnelle, dans un modèle animal proche de l'homme, comme le porc. Il s'agit d'un véritable enseignement préclinique et une passerelle entre la formation sur simulateurs et la formation sur l'humain en salle de cathétérisme.

La problématique est la même pour la formation des ingénieurs d'application travaillant aux côtés des médecins et chargés de l'utilisation des matériels spécifiques que l'on utilise au cours de ces explorations et implantations de défibrillateurs.

Il est prévu de réaliser 24 séances de formation sur 3 ans soit un total de 24 porcs.

La formation comportera 3 niveaux :

- le cathétérisme veineux fémoral, le positionnement des sondes dans les différentes cavités cardiaques et l'enregistrement des signaux électriques cardiaques, l'utilisation de la radiofréquence (cautérisation),
- l'implantation de sondes de stimulation et de défibrillation cardiaques par voie jugulaire
- la formation aux nouvelles technologies en électrophysiologie et stimulation cardiaque.

Ce projet prend en compte la règle des 3R. Ce type de formation ne peut se faire que sur animal vivant et ne peut être remplacé par un modèle cellulaire ou *ex vivo*. Le nombre d'animaux utilisé est réduit car les formations se feront en regroupant les étudiants dans la mesure du possible pour assurer une formation efficace. Le choix du modèle porcin est justifié par la similitude de son anatomie cardiaque avec l'humain.

De plus, les interventions se feront sur animal anesthésié et analgésié afin de réduire au maximum l'angoisse et la douleur de l'animal lors de l'implantation des dispositifs. Le raffinement sera également pris en compte puisque avant les sessions de formation, les animaux seront en box individuels adaptés à l'espèce (d'une surface de 3m<sup>2</sup> et de 1m de hauteur, caillebotis au sol), aux parois permettant de sentir et voir leurs congénères dans une salle commune. Le cycle nyctéméral est respecté et la température constante comprise entre 23+/- 2°C. La ration journalière respecte les apports journaliers recommandés pour l'espèce et les signes de mal être seront recherchés.

6705. Le «connectome intestinal», de l'ensemble interconnecté constitué par le système nerveux entérique (SNE) et les cellules entéro-endocrines (CEE) contribue à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques parmi lesquelles figurent la barrière intestinale et le comportement alimentaire. Les modulations de la structuration et/ou du fonctionnement de ce connectome peuvent donc avoir des répercussions immédiates quant à la susceptibilité à des pathologies inflammatoires intestinales ou métaboliques. En outre, dans la mesure où la plasticité des 2 composantes de ce connectome apparaît dépendante de l'âge, l'occurrence de telles modulations au cours de la période néonatale pourrait également avoir des répercussions à long-terme (c'est-à-dire « programmer ») la susceptibilité ultérieure (ie chez l'adulte) à ces pathologies.

Parmi les facteurs connus pour moduler les CEE et le SNE chez l'adulte, figurent le microbiote intestinal dont la mise en place, qui s'effectue au cours du développement néonatal, est connue pour être affectée par la nutrition néonatale, en particulier par la consommation d'oligosides prébiotiques qui sont communément ajoutés aux formulations infantiles lactées pour mieux mimer le lait maternel. Présument de la transposabilité de ces constats à l'animal nouveau-né malgré l'immaturation de ses intestins et connectome, nous supposons que la consommation néonatale d'oligosides prébiotiques module la maturation du connectome intestinal et que cette modulation précoce affecte, chez l'adulte, certaines des fonctions physiologiques que ce connectome régle

Le projet proposé a donc pour objectif d'identifier les répercussions immédiates et à long-terme de suppléments néonataux en oligosides prébiotiques sur le microbiote intestinal, le phénotype et la fonctionnalité du connectome.

La réalisation d'un tel objectif requiert un modèle d'étude incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu dans les régulations impliquant le microbiote intestinal et permettant un suivi au cours du développement. L'expérimentation animale ne peut donc pas être remplacée.

L'étude principale consiste à comparer, en référence à une alimentation non supplémentée, les impacts de suppléments néonataux, appliquées chez le raton entre le 5<sup>e</sup> et le 14<sup>e</sup> jour de vie, en 3 oligosides prébiotiques utilisés en alimentation humaine, sur la structuration et le fonctionnement du connectome intestinal. Ces impacts seront déterminés, à partir d'échantillons prélevés post-mortem, à 3 moments : i) immédiatement après modulation du microbiote (ie en fin de supplémentation), ii) à l'âge adulte, après induction d'un stress capable d'affecter la barrière intestinale et iii) à l'âge adulte dans des conditions basales.

Au total, ce projet inclura 24 femelles saillies et leurs descendances (ie 120 rats au total). Douze mères allaitantes et 96 descendants mâles seront utilisés pour l'étude principale. Ce nombre de descendants a été réduit au minimum nécessaire (8 animaux X 4 suppléments X 3 moments) pour évaluer statistiquement les impacts étudiés en tenant compte de la variabilité interindividuelle. Compte tenu de l'impact connu des œstrogènes sur la barrière intestinale, seuls des rats mâles peuvent être inclus dans cette recherche d'impacts. Cette contrainte, lorsque combinée avec notre volonté de s'affranchir de l'influence de la mère biologique en reconstituant des portées strictement comparables par adoption systématique, impose de disposer d'un nombre suffisant de portées naturellement composées d'un nombre de mâles qui soit un multiple de 4. Sur la base de notre expérience antérieure relative aux risques de non fécondation et au nombre de mâles par portée naturelle, ceci requiert d'inclure initialement 24 femelles saillies.

Pour éviter un gaspillage inutile des animaux, certaines (3 à 5 selon le nombre de rats effectivement surnuméraires) des mères allaitantes surnuméraires et des descendants excédentaires (24 à 40) seront utilisés pour une étude ancillaire destinée à caractériser l'impact du ralentissement du transit intestinal sur la composition du microbiote intestinal et son dialogue avec la muqueuse intestinale.

A l'exception des rates allaitantes accompagnées de leurs portées, tous les animaux inclus dans l'étude principale, qui requiert des suivis fiables de la consommation alimentaire, seront élevés en cage individuelle enrichie par la mise à disposition de tunnels plastiques et auront accès ad libitum à un aliment standard adapté aux animaux en gestation, lactation ou croissance et à de l'eau du robinet. Les descendants inclus dans l'étude ancillaire seront hébergés dans les mêmes conditions si ce n'est que 2 animaux seront réunis par cage.

Les procédures prévues relèvent toutes de la classe de sévérité « légère » : les interventions les plus invasives consistant en des prélèvements sanguins à la queue et en des gavages (supplémentation des rats en oligosides prébiotiques, administration de marqueurs de transit ou de perméabilité). Ces interventions ainsi que le protocole d'évitement de l'eau utilisé pour augmenter la perméabilité intestinale généreront des stress ponctuels mais ne devraient pas entraîner de souffrance durable pour les animaux. Ceci sera vérifié par observation quotidienne des animaux (y compris le weekend) basées sur des critères physiologiques (poids), comportementaux (consommation de nourriture, fuite ou défense de l'animal à la manipulation, activité) et d'apparence de l'animal (poil, posture) pour établir des scores à partir desquels les éventuelles décisions d'administration d'analgésique ou d'euthanasie seront établies.

Les prélèvements tissulaires nécessaires aux études seront effectués après euthanasie des animaux par décapitation après anesthésie.

6706. La signalisation Notch est essentielle au cours du développement, et également chez l'adulte car elle contrôle l'homéostasie cellulaire en contrôlant les voies de différenciation des cellules et le renouvellement des cellules souches. Plusieurs maladies génétiques sont dues à des altérations de cette voie. Par ailleurs, des altérations de cette voie de signalisation sont à l'origine de plusieurs maladies non congénitales, et jouent un rôle particulièrement important dans divers types de cancers. Des thérapies ciblant Notch sont donc potentiellement intéressantes mais sont limitées par une toxicité trop importante. Un ciblage de régulateurs tissu-spécifiques de cette voie pourrait s'avérer particulièrement intéressant.

Nous avons récemment découvert de nouveaux régulateurs de cette voie. L'ensemble des résultats ont été obtenus *in vitro*, ils ne permettent pas d'appréhender l'importance physiologique de ce niveau de régulation, ni sa spécificité de tissu.

Nous avons produit des souris portant un gène recombiné de l'un de ces nouveaux régulateurs. Le projet vise à caractériser le phénotype de ces souris en s'attachant plus particulièrement à l'étude de l'homéostasie intestinale. Un deuxième aspect porte sur le rôle de ce régulateur dans le développement des cancers intestinaux. Cette question sera abordée en croisant nos souris avec des souris porteuses d'un allèle APC muté qui développent spontanément des tumeurs intestinales.

Nous estimons que le nombre de souris qui devront être produites pour ce projet est de 636. La règle des trois R a été prise en compte : remplacement : la plupart des questions posées par notre projet sont adressées par des approches *in vitro*; réduction : Le nombre d'animaux utilisés est minimisé autant que possible, en évitant des séries inutilement trop grandes, ou en utilisant les animaux pour plusieurs analyses post-mortem ; raffinement : Ce projet ne comporte que très peu d'intervention sur l'animal vivant puisque pour l'essentiel nous prélèverons des organes sur des animaux sacrifiés suivant les recommandations en vigueur. De plus les tumeurs observées du fait de la mutation du gène APC sont peu nombreuses ce qui devrait limiter la douleur. Les signes de douleurs seront surveillés régulièrement et le cas-échéant les animaux seront traités avec un antalgiques. Un arrêt de l'expérience sera envisagé dans le cas de douleurs résistantes aux antalgiques.

6707. La maladie de Huntington est une maladie rare neurodégénérative pour laquelle aucun traitement n'est à ce jour découvert. La pathologie est principalement décrite par des signes neurologiques, psychiatriques et moteurs, mais elle touche l'ensemble des organes, dont les muscles. Les patients sont en effet atteints d'une fonte musculaire majeure au stade terminal. Cette maladie est

génétique et est liée à la fois à la baisse de la protéine normale (la huntingtine) et à l'expression d'une protéine mutée. La huntingtine est retrouvée dans l'ensemble des cellules, elle n'est pas spécifique des neurones. Elle est notamment exprimée dans le muscle. L'absence totale de protéine chez la souris est létale dès la naissance. Afin d'étudier le rôle de cette protéine dans le muscle, nous voulons développer et caractériser deux modèles murins dans lesquels la protéine huntingtine est absente uniquement des muscles. Nous pourrions comprendre l'impact de la huntingtine en étudiant la force musculaire et la structure des muscles de ces modèles. Le modèle murin est le plus adapté car il n'est pas possible de remplacer ce modèle par les modèles *in vitro* pour étudier la force musculaire globale ainsi que la structure à l'échelle des fibres. Le suivi de l'état de santé des animaux sera quotidien pour permettre une intervention rapide si les signes de souffrance sont détectés. 240 animaux sont nécessaires pour la mise en place et la caractérisation du modèle. Ce nombre d'animaux a été calculé afin de ne pas compromettre la validité statistique des résultats. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement : contrôle visuel, mesure du poids des animaux, et une surveillance particulière de la respiration des souris. La fréquence de la surveillance sera adaptée à la situation de chaque souris. Les critères d'observation proposés seront évalués dans les premières phases du projet, et pourront être modifiés si besoin. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée si des signes de souffrance apparaissent.

6708. Le maintien d'un organe et la régénération tissulaire repose sur l'existence de cellules particulières appelées cellules souches. Ces cellules existent dans les tissus adultes et ont récemment été identifiées dans des "zones de transition". Ces régions représentent la jonction entre deux types d'épithélium et de façon intéressante sont le siège privilégié du développement de carcinomes squameux qui font partie des cancers les plus abondants et agressifs chez l'homme. Par exemple, au niveau du col de l'utérus, les cancers apparaissent exclusivement à la jonction du vagin et de la région cervicale. Dans les cancers de l'anus, les tumeurs présentes dans la zone de transition anorectale sont trois fois plus fréquentes et le pronostic moins favorable que les cancers retrouvés dans le canal anal. Enfin, dans les cancers de l'œsophage la zone de transition entre l'œsophage et l'estomac est souvent affectée. Les connaissances actuelles dans ce domaine sont basées largement sur des études de cas humains limitées à des évidences descriptives et corrélationnelles et ne permettant pas de définir les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons créé des modèles animaux uniques qui développent des cancers dans des zones de transition que nous utiliserons pour investiguer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'initiation et le maintien de ces tumeurs. L'hébergement de nos souris se fera en confinement adapté à la stabulation et au travail avec les lignées murines immunodéprimées. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. Les locaux d'hébergement et les postes d'expérimentation chirurgicale sont séparés. Les souris de ce projet sont hébergées en groupe (enrichissement social) et un enrichissement complémentaire consistera dans l'ajout de « copeaux compressés » (Nidification). Lors de la phase opératoire de greffe, outre l'anesthésie durant la chirurgie, en matière de raffinement nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur et souffrance.

Nous utiliserons des méthodes alternatives pour valider les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, incluant des essais de migration et d'invasion *in vitro* (Chambre de Boyden) pour tester les propriétés invasives des cellules en culture et nous développerons des méthodes de cultures tridimensionnelles de type organoïdes. Cependant, les cellules placées en culture peuvent changer de propriétés justifiant l'utilisation d'essai *in vivo* chez la souris pour pouvoir obtenir des conclusions significatives. Ce projet utilisera des souris immunodéficientes de type Nude (400 individus) et des souris génétiquement modifiées élevées dans le laboratoire, (1225 individus) soit 1625 individus sur 5 ans.

6709. Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé (définition de l'organisation mondiale de la santé). En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, dont les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Face à ce problème majeur de santé publique, plusieurs approches sont utilisées, dont l'utilisation de compléments alimentaires permettant de limiter la prise de poids et/ou les désordres métaboliques associés à l'obésité (notamment l'insulino-résistance).

Dans ce projet nous chercherons à mettre en évidence l'effet d'un mélange d'ingrédients (de composition confidentielle car développée par un partenaire industriel) sur l'obésité et les désordres physiopathologique qui lui sont associés, dans le but ultime de développer un complément alimentaire chez l'homme.

Dans cette étude, des souris mâles de souche C57Bl6j seront rendues obèses par la consommation d'un régime riche en lipides (HF45, 45% de l'énergie apportée) pendant 7 semaines puis seront suivies pendant 7 semaines supplémentaires et consommeront soit le même régime HF45 soit un régime supplémenté par un ingrédient de composition confidentielle mis au point par notre partenaire industriel. Un groupe recevant un régime à teneur normale en lipides (régime d'entretien AIN-93M) pendant toute la durée de l'étude (14 semaines) servira de groupe contrôle normopondéral. Le nombre total d'animaux nécessaires sera de 60.

Afin de mettre en évidence le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques, une combinaison de mesures sont prévues :

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire ;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique ;
- passages en cage calorimétrique pendant 24 heures afin de mesurer différents paramètres permettant d'affiner la caractérisation du phénotype obèse (consommation d'oxygène et expiration de dioxyde de carbone, prise alimentaire et hydrique) ;
- collection de fèces en début puis au cours du protocole pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime ;
- mesure de la réponse glycémique à une charge orale en glucose (semaine 12) et à une injection intrapéritonéale d'insuline (semaine 13) afin de mettre en évidence des anomalies du métabolisme glucidique.

A l'issue des 14 semaines de régime, les animaux seront sacrifiés sous anesthésie générale.

Cette étude prend en compte la règle des 3 R :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier l'impact de compléments alimentaires sur le microbiote et la prévention de l'obésité. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives et l'utilisation de cages calorimétriques permet de recueillir un grand nombre de données (enregistrement sur 24 heures) en utilisant un faible nombre d'individus (8 souris/groupe). L'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal.

6710. La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie biliaire fibrosante pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement médical. L'objectif de notre projet est de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activation du récepteur membranaire des acides biliaries TGR5, a un rôle protecteur dans la CSP. Pour vérifier cette hypothèse, nous étudierons l'effet d'un agoniste de TGR5 dans le modèle murin le mieux établi de CSP, les souris invalidées pour *Abcb4*.

Nous évaluerons les conséquences de ce traitement sur les manifestations de la CSP, notamment la fibrose biliaire.

Une telle recherche à visée thérapeutique ne pouvait être abordée que par l'analyse d'un modèle animal de CSP comme les souris invalidées génétiquement pour *Abcb4*.

Type d'animaux : Souris *Abcb4*<sup>-/-</sup> sur fond FVB/n.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 168 souris pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé tout en respectant les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrits au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animaux et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Au cours de ce projet, un objectif de réduction du nombre des animaux engagés sera poursuivi avec insistance de par l'analyse des données générées en continue.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification. 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, une démarche en constante de raffinement sera mise en œuvre grâce à l'amélioration permanente des conditions d'hébergement (enrichissement, soins, etc.) et des protocoles décrit dans la saisine.

6711. La dégénérescence du disque intervertébral (DIV) conduit à des douleurs lombaires particulièrement douloureuses et invalidantes. Les traitements à visée symptomatique disponibles actuellement devraient laisser la place dans les prochaines années à des approches de médecine régénératrice. En effet, l'amélioration des connaissances sur la physiopathologie discale ainsi que sur les cellules souches mésenchymateuses (CSM) offrent de nouvelles perspectives de traitement comme l'ingénierie tissulaire qui est basée sur la réparation d'un tissu lésé par une association de cellules régénératrices et de biomatériaux. Ce type d'approche est actuellement en cours d'investigations par la transplantation de cellules régénératrices dérivées de cellules souches à l'aide d'un hydrogel injectable auto-durcissant. L'utilisation de cellules souches implique la définition des modalités de différenciation de celles-ci afin d'obtenir des cellules au phénotype proche des cellules natives du NP. Dans ce contexte, des études préliminaires doivent être réalisées et font l'objet de la présente demande.

Un ou plusieurs cocktails de différenciation des cellules souches en cellules au phénotype proche de cellules du NP sont en cours de validation. L'efficacité de cette différenciation nucléopulpo-génique *in vitro* sera ensuite évaluée *in vivo* par injection de cellules souches ainsi différenciées à l'aide d'un hydrogel dans des poches sous cutanées chez la souris Nude. Cette évaluation *in vivo* chez l'animal fait l'objet de cette demande. Environ 70 souris Nude seront nécessaires à la mise en œuvre de ces expérimentations. La formation d'un tissu adéquat sera suivie chez la souris par des techniques histologiques et immunohistologiques nécessitant l'euthanasie des 40 animaux quelques semaines après implantation des cellules associées à l'hydrogel. L'ensemble des expérimentations seront réalisées en respectant la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Par ailleurs, les souris seront observées quotidiennement la première semaine après la chirurgie puis 2 fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation. De plus, des études antérieures semblables à celles développées dans la présente demande ont d'ores et déjà été menées. Ces études ont permis d'observer que les animaux ne montrent pas de signes de souffrance suite à la l'injection en sous-cutané du substitut.

Les résultats de ces expérimentations permettront d'établir ensuite la preuve de concept de l'utilisation d'une approche de médecine régénératrice pour le traitement de la dégénérescence discale, tout d'abord par de futurs essais précliniques chez l'animal (qui feront l'objet d'une demande préalable) avant d'engager un essai clinique chez l'homme.

6712 La biologie de la cellule cancéreuse présente une plasticité qui peut être modulée ou reprogrammée pour maintenir un état plus différencié et moins agressif afin de limiter sa croissance et sa capacité à métastaser. Le but principal de notre projet est fondé sur ce concept. Nous cherchons à identifier des facteurs pouvant induire la reprogrammation des cellules tumorales. Nous étudions, un complexe neuropeptide et son récepteur ainsi que des hormones et anti-hormones stéroïdiennes utilisées à des fins thérapeutiques. Nous avons montré que lorsque le complexe, neurotensine /récepteur de haute affinité, NTS/NTSR1, est présent dans les cellules cancéreuses les effets cellulaires à caractère oncogénique (croissance, adhérence, invasion, migration) sont amplifiés. La forte expression du NTSR1 est un marqueur pronostique indépendant dans les tumeurs du sein et du poumon. Dans des tumeurs expérimentales de sein et de poumon, nous avons démontré la contribution du complexe NTS/NTSR1 dans la croissance des tumeurs et l'émergence de métastases.

Notre projet est de comprendre les mécanismes cellulaires, moléculaires et les signalisations mises en jeu. Pour cela, nous avons développé des approches précliniques utilisant les lignées cancéreuses afin de démontrer la contribution de ce complexe dans la croissance tumorale et dans le processus métastatique. La première phase du projet a été de produire une molécule thérapeutique ciblant le complexe NTS/NTSR1. De tester leur efficacité sur la progression tumorale et la réponse aux agents anti-tumoraux utilisés dans les protocoles cliniques. Notre projet de recherches translationnelles, développe ces aspects précliniques sur des tumeurs expérimentales, à partir de lignées cellulaires cancéreuses présentant différents degrés de différenciation et d'agressivité. L'objectif à terme étant de déterminer des combinaisons thérapeutiques permettant de diminuer la progression tumorale chez l'homme.

Nous souhaitons utiliser dans le cadre de ce projet un modèle d'allogreffe chez la souris immunocompétente le modèle de Lewis (lignée cellulaire LLC1).

Ce projet devrait utiliser au maximum 648 souris sur 5 ans. Chaque groupe de traitement inclura 10 souris. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal qui reste cependant indispensable. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicole (coton, maison, etc.).

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

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

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

6713 Le projet a pour but la préparation d'un réactif (coupe de tissus de rat et de souris) nécessaire à la détection de plusieurs autoanticorps, marqueurs diagnostique et pronostique de maladies auto-immunes.

Notre département est spécialisé en auto-immunité (principalement hépatique) depuis plus de 30 ans et assure la détection en routine d'environ 80 d'autoanticorps nécessaire au diagnostic, au pronostic et au suivi de nombreuses maladies auto-immunes.

Leur méthode de détection est basée sur l'immunofluorescence indirecte sur différentes coupes tissulaires. Par exemple, les marqueurs d'intérêt en hépatologie sont recherchés sur coupes de foie/rein/estomac de rat qui peuvent être commerciales (également issue de rats) ou fabriquées au laboratoire. Notre département a toujours préparé ces coupes. En effet, de meilleure qualité que les coupes commerciales, elles nous permettent une plus grande facilité de lecture et donc une utilisation beaucoup plus rationalisée et in fine moins d'animaux pour la préparation de ces coupes.

Type d'animaux : Rat et souris (modèles commerciaux)

Nombre d'animaux : 30 rats WISTAR et 30 souris SWISS.

Remplacement : Pas de remplacement possible, les lames commerciales sont également des tissus de rat et de souris. De plus, ces lames commerciales sont de moins bonnes qualités et entraîne donc une utilisation plus importante de lames et donc d'animaux.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux qui est calculé au plus juste en fonction de notre activité.

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

6714. Ce projet a pour but de caractériser les réponses physiologiques liées à la dépense énergétique qui sont mises en place dans des situations stressantes selon la durée (aigüe ou chronique) du stress. Nous nous intéresserons plus précisément au rôle de la corticostérone, principal glucocorticoïde sécrété au cours de la réponse au stress chez les vertébrés. Cette hormone joue un rôle important dans la régulation de l'énergie au sein de l'organisme et l'adaptation à une perturbation de l'environnement. Pour notre projet étudiant le stress, aucune méthode alternative n'est disponible pour remplacer l'animal. Afin de pouvoir simuler expérimentalement une sécrétion de cette hormone, nous appliquerons chaque jour des crèmes enrichies en corticostérone sur le dos de la moitié d'un lot expérimental de lézards vivipares *Zootoca vivipara* que nous comparerons à un lot témoin (48 individus). Cette

procédure induit une augmentation de la corticostérone plasmatique à un niveau similaire aux valeurs maximales observées en populations naturelles. Des mesures de dépenses énergétiques totales au repos (par calorimétrie indirecte), de dépenses énergétiques maximales (par quantification de l'endurance) et de métabolisme mitochondriale hépatique et musculaire (par prélèvement et analyse de la respiration, production d'ATP et production de ROS des mitochondries après euthanasie) seront effectuées 1-3 jours, 11-13 jours et 21-23 jours après le début de l'expérience sur 3 lots séparés de lézards. Cette durée d'exposition correspond à une transition d'un stress aigu à un stress chronique par rapport au cycle de vie de l'espèce. Nous espérons démontrer l'existence d'une réponse non-linéaire des fonctions métaboliques au cours du temps avec une mobilisation énergétique associée à des coûts en respiration, production de ROS et efficacité mitochondriale dans les premiers jours suivie d'une adaptation de la fonction mitochondriale dans un deuxième temps. Le nombre de répétitions temporelles et d'individus par groupe a été décidé pour réduire le nombre d'animaux utilisés et pour optimiser la probabilité de détection d'effets sensibles par rapport à nos études précédentes. Les protocoles sont raffinés pour limiter la souffrance de l'animal dans les phases de contention, de test et d'euthanasie.

6715. L'ibrutinib a montré une efficacité dans le traitement de patients présentant un lymphome des cellules du manteau (MCL), une leucémie lymphocytaire chronique (CLL) / petite leucémie lymphocytaire (SLL), ou lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL). Ces pathologies peuvent être associées à des localisations cérébrales ou du système nerveux central. Alors qu'elle conditionne l'efficacité du traitement dans les formes méningées, la distribution cérébrale de l'ibrutinib n'a pas encore été évaluée à ce jour. L'objectif de cette étude est d'évaluer et de caractériser le passage cérébral de l'ibrutinib administré selon différentes modalités. Aucune méthode non animale ne peut être utilisée pour atteindre les objectifs de notre projet. Conformément à la règle des 3R, nous limiterons au maximum le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet (72 souris) et une attention toute particulière sera portée sur leur bien-être. Nous réaliserons en particulier un suivi quotidien très attentif des animaux. Les souris en expérimentation présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique (perte de poids, poils hirsutes, dos voûté, agressivité) seront euthanasiées selon une méthode réglementaire.

6716. Le système immunitaire met en place des stratégies efficaces pour lutter contre les pathogènes grâce à une réponse adaptative protectrice mais aussi est capable de contrôler des réactions anormales afin d'éviter les syndromes auto-immuns. Le système immunitaire est doué d'une mémoire et celle-ci est mise à contribution afin de prévenir les maladies par des stratégies de vaccination contre les pathogènes mais aussi contre les cellules tumorales qui souvent se développent lentement sans stimulation efficace du système immunitaire.

Dans nos études précédentes, nous avons caractérisé avec précision les cellules sentinelles du système immunitaire et présentes dans la peau. Il s'agit de différentes populations de cellules dendritiques de l'épiderme (LCs, CD207+CD11b+), et du derme CD207+CD11b- (CD103- et CD103+), CD207-CD11b- et CD207-CD11b+. Nous avons poursuivi la caractérisation des cellules CD207-CD11b+ du derme afin de pouvoir distinguer les DCs, des monocytes et des macrophages. Par ailleurs, nous avons associé certaines populations de cellules dendritiques à des fonctions uniques du système immunitaire. Le but du projet est de mieux comprendre les fonctions de ces cellules immunitaires des tissus afin de mieux comprendre les facteurs qui participent à l'immunité périphérique dans l'objectif d'utiliser cette connaissance pour améliorer les traitements et les stratégies vaccinales. Une étude équivalente chez l'homme nécessiterait l'accès à des échantillons d'individus immunodéprimés et nécessiterait des prélèvements invasifs (peau, ganglions drainant la peau). Dans l'impossibilité d'acquiescer ce type d'échantillons, l'utilisation de modèles animaux est cruciale pour répondre à nos questions scientifiques. En effet, nous avons développé des modèles animaux murins qui nous permettront d'étudier ces différentes populations *in vivo* dans leur environnement afin de mieux comprendre leurs fonctions biologiques en présence de cellules tumorales de type mélanome mais aussi d'étudier différentes approches d'immunisation afin de mieux contrôler la réponse protectrice anti-tumorale et la réponse tolérogénique dans le diabète de type I.

Les animaux inclus dans les différentes procédures expérimentales seront utilisés en nombre suffisants pour permettre des analyses statistiques valides. Au total, nous avons estimé que 11448 animaux seront nécessaires pour finaliser l'étude décrite dans le projet. Pour toute expérience nécessitant une manipulation de l'animal, ceux-ci seront anesthésiés avec les méthodes autorisées. Lorsque le système immunitaire sera compromis, les souris seront traitées avec des antibiotiques (bactrim) et des antidouleurs (ibuprofène).

6717. Les maladies hépatiques chroniques telles que la cirrhose du foie et le carcinome hépatocellulaire (CHC) sont des défis majeurs pour la santé mondiale. Le CHC est en effet la 2ème cause de mort par cancer dans le monde. Les thérapies permettant le traitement de cette pathologie sont très limitées et les stratégies thérapeutiques visant à prévenir le CHC chez les patients à risque, infectés par le virus de l'hépatite B ou C (VHB, VHC), et présentant une cirrhose hépatique ou une fibrose avancée sont inexistantes. De plus, il a été montré que même suite à l'éradication du VHC, le risque de développement de CHC persiste quand une fibrose avancée est déjà présente. Cette absence d'option thérapeutique reflète notre méconnaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la progression de la maladie hépatique. Les modèles animaux de développement de CHC existent mais reposent tous sur l'apparition de cancers à partir des cellules de l'hôte. Il peut ainsi être difficile d'extrapoler les résultats obtenus chez l'animal à l'homme. Ainsi, afin d'étudier le développement de carcinome hépatique à partir de cellules humaines, nous souhaitons utiliser nos modèles de souris chimériques au foie humanisé uPA/SCID-bg et FRG-NOD. Ces différents modèles de souris sont immunodéficients et peuvent être transplantés avec des hépatocytes humains qui vont repeupler la majorité du foie de l'animal. Nous envisageons donc d'utiliser nos modèles de souris afin d'étudier le développement de CHC à partir d'hépatocytes humains greffés dans un contexte d'induction chimique au diethylnitrosamine (DEN) en condition d'infection virale par le VHC ou le VHB (+/-VHD), ou non. Nous étudierons les voies moléculaires impliquées dans le développement et la progression de la maladie sur les cellules humaines. Pour cette étude

nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à 480. Afin de remplacer et de réduire au maximum le nombre d'animaux requis la majorité des expériences seront menées en amont, *in vitro* sur des lignées cellulaires et *ex vivo* sur des biopsies de patients atteints de maladie hépatique (VHC, VHB, cirrhose, stéatose hépatique non alcoolique...), ce qui nous permettra de sélectionner finement les gènes clés les plus importants. Afin de raffiner au mieux notre méthodologie nous avons mis en place 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. Les résultats obtenus seront statistiquement analysés par les tests appropriés (t-test, Mann-Withney, log-Rank...)

6718. Ce programme a pour objectif l'étude des mécanismes initiateurs de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) humaine. Dans la mesure où cette problématique ne peut être abordée en recherche clinique chez les patients, nous utiliserons un modèle de GVH xénogénique humaine chez la souris immunodéficiente de fond génétique NSG.

Les animaux (2 mois) seront injectés par voie veineuse avec diverses préparations cellulaires enrichies en lymphocytes T et/ou en progéniteurs hématopoïétiques. Nous étudierons ensuite la cinétique de recrutement et d'activation des sous-populations lymphocytaires T au niveau des organes cibles de chacune des deux composantes de la GVH : épithéliale (foie, intestin, peau) et hémato-lymphoïde (moelle osseuse). Les populations d'intérêt seront ensuite isolées à partir des organes cibles de la maladie en vue d'une caractérisation fonctionnelle et moléculaire. Nous nous engageons à respecter la démarche éthique européenne appliquée à l'expérimentation animale dite « règle des 3R », notamment en limitant au minimum le nombre des animaux utilisés (seuil de validation statistique) et en les euthanasiant dès l'apparition des premiers signes clinique de la maladie afin de leur épargner toute souffrance inutile. La pertinence des résultats obtenus dans ce modèle sera testée secondairement sur une cohorte de patients. Nous recherchons notamment des marqueurs sanguins de l'agression tissulaire.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre de 720 souris sur une durée de 3 ans.

6719. Les poissons *téléostéens* ont été récemment cooptés au rang d'animaux modèles pour les analyses comportementales, aussi bien pour des comportements « innés » (fonctions motrices et sensorielles) que pour des comportements dits « de fonctions cérébrales supérieures » (émotions, motivation, apprentissage). Ces comportements sont conservés au cours de l'évolution, mais leurs bases neuroanatomiques restent mal comprises, et il est clair que le développement toujours croissant de modèles *téléostéens* génétiquement modifiés pour aider à cette compréhension. Pour permettre ces études, plusieurs procédures expérimentales ont été mises en place au sein d'une plateforme d'étude comportementale du poisson *zèbre*. La plateforme met à disposition un ensemble de tests comportementaux adaptés à des modèles aquatiques permettant de mesurer locomotion, anxiété et stress, agression, et mémoire émotionnelle et spatiale. La plateforme pourra donc contribuer à l'avancée de plusieurs domaines tels que les tests pharmacologiques applicables chez l'homme ou encore l'évaluation du bien-être animal sous certaines conditions environnementales. La plateforme contribue aussi à la formation de personnes aux diverses techniques appliquées dans des métiers qui comportent la réalisation de procédures expérimentales sur des animaux. Le projet consiste à proposer ces protocoles standardisés à des collaborateurs extérieurs et à développer de nouveaux tests afin d'élargir la gamme de services proposés. Chaque collaborateur pourra choisir d'effectuer une à plusieurs procédures. Le nombre total d'animaux utilisés est estimé à 3500. Ce nombre a été calculé par l'estimation de la réalisation des procédures expérimentales demandées par un collaborateur et selon la capacité d'accueil de la plateforme durant le projet. Nous aurons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

Remplacement : Les comportements observés sur les animaux aquatiques sont non prévisibles ou reproductibles. Notre projet nécessite donc une approche *in vivo* sur l'animal.  
Réduction : Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Par ailleurs, lors d'analyses comportementales l'animal pourra être son propre témoin ou encore être utilisé lors de plusieurs procédures expérimentales diminuant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement : Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Les autres manipulations, invasives ou nécessitant une immobilisation, seront conduites sur animaux anesthésiés. Dans chaque cas, nous suivrons les signes visibles d'un animal souffrant et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience ou à une euthanasie.

6720. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant d'évaluer les effets pharmacologiques principaux des substances étudiées, par rapport aux cibles thérapeutiques visées. Ils permettent également d'établir le profil de sécurité de nouvelles substances médicamenteuses avant leur passage chez l'homme, et ce dans le cadre des recommandations européennes, américaines ou japonaises en vue de l'obtention des autorisations de mise sur le marché. Les tests utilisés dans ce cas sont des modèles prédictifs pour l'évaluation des risques au niveau du système nerveux central et plus particulièrement l'abus et la dépendance. L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substance pharmacologiques sur le comportement animal de façon à prédire leur efficacité clinique et leur sécurité, et tout particulièrement l'évaluation du risque à induire une addiction ou des symptômes de sevrage. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés lors des années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 15000. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.



6721. Dans le système nerveux central, les neurones communiquent entre eux en libérant des neurotransmetteurs au niveau de petites structures appelées synapses, dans lesquelles on trouve des récepteurs spécifiques de ces neurotransmetteurs. Le glutamate est le neurotransmetteur excitateur majoritaire dans le cerveau. La mobilité de certains des récepteurs du glutamate semble jouer un rôle important dans l'apprentissage et de la formation de la mémoire. Pour tenter de confirmer cette hypothèse basée sur des données obtenues *in vitro* de neurones en culture, nous allons étudier la mobilité des récepteurs au glutamate sur des tranches de cerveaux de rats et caractériser *ex vivo* comment cette mobilité pourrait changer pendant les mécanismes cellulaires qui permettent l'apprentissage. La difficulté est de visualiser ces récepteurs du glutamate. Une approche possible consiste à transfecter les ADN codant pour ces récepteurs, étiquetés avec une molécule fluorescente facilement repérable en microscopie. L'analyse de la mobilité de ces récepteurs se fera sur des animaux entre 15 et 21 jours au stade où l'architecture de l'hippocampe arrive à maturité et où l'expression des récepteurs recombinants devrait être stable. Pour que les ADN transfectés aient le temps de s'exprimer, nous allons procéder à leur injection par l'électroporation *in utero* dans le cerveau de fœtus. Ces injections auront lieu au 16ème jour de gestation, stade du développement embryonnaire où la neurogenèse est importante et l'incorporation d'ADN maximale. Entre 15 et 21 jours après la naissance, le cerveau des rats sera prélevé pour étudier en imagerie et en électrophysiologie comment l'application de protocoles activant les mécanismes cellulaires de l'apprentissage entraîne des changements de mobilité des récepteurs du glutamate et du fonctionnement des réseaux de neurones. A titre de contrôle, les mêmes expériences seront reproduites sur un groupe d'animaux électroporés avec un ADN pour un récepteur non impliqué dans l'apprentissage (récepteur dopaminergique D1 recombinant), un groupe d'animaux ayant été électroporés avec un ADN codant la GFP. Dans le respect du R de réduire, il est prévu un échantillonnage de 20 animaux /groupe, pour pouvoir conduire en parallèle les expériences d'imagerie et d'électrophysiologie et avoir un échantillonnage statistique suffisant. En incluant dans ce décompte, le nombre de femelles gestantes nécessaires, il faut un total de 70 animaux. Dans le respect du R de raffiner de la règle des 3R, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Des points limites suffisamment prédictifs seront définis pour réduire la souffrance tout au long de la vie de l'animal.

6722. Le paludisme est la maladie parasitaire la plus meurtrière au monde, et reste aujourd'hui sans vaccin efficace et avec de nombreuses résistances aux traitements. Le meilleur moyen de combattre la maladie reste la lutte anti-vectorielle qui passe par l'identification des populations de moustiques ainsi que la détermination de leur statut infectieux quant au *Plasmodium* (agent causal du paludisme). Les méthodes actuelles d'identification des arthropodes et de détection des agents pathogènes sont longues, nécessitent des connaissances entomologiques et restent coûteuses. Le MALDI-TOF est une technologie de routine pour l'identification des bactéries et a maintenant émergé pour l'identification des arthropodes ainsi que la détection directe de leurs pathogènes associés. Dans ce projet, nous voulons évaluer la capacité du MALDI-TOF à différencier des moustiques infectés ou non par *Plasmodium berghei*. Les moustiques seront nourris sur des souris rendues parasitémiques. Aucune méthode alternative ne peut être utilisée pour remplacer l'animal.

Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées, eau et aliments à volonté. Pour le confort des souris, un enrichissement sera mis en place à l'aide d'igloos et du matériel de nidification pour réduire toute angoisse. Le gorgement des moustiques sera effectué sur des souris sous une anesthésie générale. Les animaux seront surveillés jusqu'à leur réveil. Le statut infectieux des moustiques sera contrôlé par biologie moléculaire et leurs spectres MALDI-TOF seront comparés.

Ce projet nécessitera au total 56 souris.

6723. Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des néoplasies hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes chez l'Homme. Ces pathologies sont souvent considérées comme des « maladies orphelines », reflétant ainsi les difficultés rencontrées pour leur classification, diagnostic et traitement.

Nous souhaitons tester l'impact de stimulations chroniques sur la transformation des lymphocytes T. Pour cela, nous utiliserons un phénomène de prolifération lymphocytaire T dépendant du récepteur antigénique des lymphocytes T (TCR).

1/ Des lymphocytes T provenant de souris WT ainsi que des lymphocytes T issus de souris déficientes pour p53 seront inoculés à des souris receveuses immunodéficientes et nous suivrons les souris receveuses afin de voir si dans ces conditions elles développent des lymphomes T.

2/ En cas de développement de lymphomes, nous chercherons les facteurs qui contrôlent la survie des cellules de lymphome. Pour cela, nous transférerons les cellules de lymphome obtenues précédemment à des souris incapables d'activer les lymphocytes T par leur TCR car incapable d'interagir avec les cellules présentant les antigènes (CMH KO).

En cas de dépendance initiale au signal par le TCR, nous testerons l'hypothèse selon laquelle les cellules de lymphome T perdent cette dépendance au cours de transfert successifs. Pour cela, nous réaliserons des expériences de transfert en série de ces lymphomes dans des souris CMHKO et WT afin d'étudier l'impact de l'environnement et de la pression de sélection sur la perte de l'interaction TCR-CMH.

Les PTCL sont des pathologies pour lesquels nous n'avons pour le moment pas de traitement efficace. Il nous faut donc développer des outils afin de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies pour pouvoir mieux les traiter. Nous ne disposons malheureusement pas ou trop peu de lignées cellulaires permettant ces études, il nous faut donc développer de nouveaux modèles animaux. Pour cela la souris est très utile car nous disposons de modèles génétiquement modifiés tels que les souris p53 KO permettant le développement plus rapide et une pénétrance plus importante de ces pathologies. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats.

Au total, nous aurons besoin de 868 souris pour cette étude. Des points limites ont été définis et décrits ci-après. Toute atteinte de ces points limites entrainera l'euthanasie immédiate de l'animal.

6724. L'immunothérapie consiste à agir sur le système immunitaire pour traiter une maladie. Cette stratégie peut être utilisée dans des domaines aussi variés que les cancers, les maladies infectieuses ou auto-immunes et les transplantations. Pendant longtemps, l'immunothérapie a consisté à administrer *in vivo* des drogues stimulant ou inhibant la réponse immunitaire. L'injection de cellules immunitaires manipulées *ex vivo* est apparue comme une alternative prometteuse dans les années 90. Plusieurs études menées chez l'homme et l'animal ont montré que les lymphocytes T CD4+ manipulés *ex vivo* peuvent être utilisés dans le traitement de cancers, d'infections virales, de maladies auto-immunes ou dans la prévention du rejet de greffe.

Nous avons développé chez la souris et chez l'homme une nouvelle approche pour manipuler les lymphocytes T CD4+ *ex vivo*. L'objectif de ce projet est d'étudier la capacité des lymphocytes T CD4+ générés par cette nouvelle méthode à (1) détruire une tumeur ou (2) prévenir un rejet d'allogreffe *in vivo*. Pour cela, les lymphocytes T CD4+ seront injectés à (1) des souris porteuses de tumeurs ou (2) des souris ayant reçu une greffe d'ilots pancréatiques ou une transplantation cardiaque. L'évolution tumorale (1) ou la survenue d'un rejet de greffe (2) seront les critères permettant de juger de l'efficacité thérapeutique des lymphocytes T CD4+ transférés.

Ces études ne peuvent se faire *in vitro* car un modèle animal est indispensable pour évaluer le potentiel thérapeutique de cette nouvelle méthode de génération de lymphocytes T CD4+. Cette nouvelle méthode pourrait permettre d'améliorer l'efficacité et les coûts des approches utilisées actuellement en thérapie cellulaire.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans compromettre l'interprétation statistique des résultats.

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux sera réalisée (classification des procédures expérimentales en classe modérée). 140 souris (BALB/c=50, C57/bl6=60, C57/bl6-ovalbumin=30) seront incluses dans ce projet.

6725. La molécule CD39 est une enzyme exprimée par de nombreuses cellules du système immunitaire infiltrant les tumeurs et certaines cellules tumorales.

CD39 est l'enzyme clé aboutissant à la production d'adénosine, molécule immunosuppressive, par dégradation de l'ATP extracellulaire.

Dans le cadre d'un projet collaboratif, nous disposons de 3 anticorps monoclonaux anti-CD39 (Ac1, Ac2 et Ac3) reconnaissant la molécule CD39 humaine et bloquant son activité enzymatique. Les 3 anticorps monoclonaux anti-CD39 sont capables de bloquer la dégradation d'ATP extracellulaire et d'empêcher la production d'adénosine, un puissant immunosuppresseur. *In vitro*, ces anticorps sont capables de restaurer la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 et d'augmenter la cytotoxicité médiée par les LT CD8 et les cellules NK. Notre hypothèse de travail est que le blocage de l'activité enzymatique de CD39 *in vivo* va permettre potentialiser la réponse immune contre la tumeur et *in fine* inhiber la progression tumorale.

Nous proposons de tester la capacité de ces anticorps à inhiber la progression tumorale *in vivo* chez la souris.

Les objectifs de ce projet sont :

1- caractériser la courbe de croissance des cellules tumorales *in vivo*

2- montrer l'efficacité d'un anticorps anti-CD39 à favoriser une réponse immune médiée par les cellules NK contre la tumeur et donc à inhiber la croissance tumorale.

Trois anticorps anti-CD39 seront testés. L'efficacité des anticorps anti-CD39 sera comparée à celle d'anticorps contrôles de même isotype.

Pour cela, des souris femelles SCID âgées de 6 à 8 semaines seront utilisées.

L'ensemble du projet respecte la règle dite "règle des 3 R" qui comprend les points suivants :

- Remplacer les modèles animaux : cette étude fait suite à de nombreuses validations des anticorps déjà effectuées *in vitro*. L'étape de démonstration de l'efficacité chez l'animal reste indispensable.

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation : le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction). Pour une première expérience le nombre de souris par groupe est fixé à 8 puis il est réduit à 6 pour une reproduction d'expérience.

- Raffiner la méthodologie utilisée : La progression tumorale sera évaluée en comparant les valeurs de volume tumoral au cours du temps. La significativité des différences de croissance tumorale sera déterminée par un test statistique.

Les souris seront surveillées quotidiennement ceci dans le but de :

o suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 20% du poids normal de l'animal,

o détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre maximal de 588 souris sur une durée de 3 ans.

6726. Les mélanomes sont des tumeurs malignes développées à partir des mélanocytes, soit en peau saine, soit plus rarement à partir d'un naevus préexistant. Ce projet portant sur des xéno greffes de lignée cellulaire de mélanome et tumeur de mélanome humain dans des souris immunodéficientes, permettra de tester des drogues sur des modèles les plus proches du mélanome humain. Cette étude pourrait apporter une contribution potentielle à la biologie et à la médecine humaine et animale et pourrait améliorer les connaissances dans la physiopathologie des mélanomes et avoir des modèles plus proches de la réalité clinique pour valider de nouvelles drogues.

Notre projet s'inscrit dans les recommandations de la règle des 3 R. En effet, une partie de notre projet scientifique est réalisée *in vitro* mais des études sur un modèle *in vivo* sont nécessaires à la validation des résultats. Néanmoins, le nombre d'animaux est réduit au

maximum (2000 souris sur 5 ans) et l'ensemble des expériences *in vivo* seront réalisées dans le respect du bien-être des souris. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé pour détecter tous signes de douleur/souffrance qui conduiront à leur euthanasie.

6727. L'œil est l'organe majeur de la vision. Il a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse contenue dans les photons en influx nerveux. Ces messages nerveux sont ensuite transmis jusqu'au cortex visuel et interprétés en images. La conversion de l'information lumineuse en information électrique est réalisée par le mécanisme de photo transduction. Ce mécanisme se déroule au niveau de la couche la plus interne de l'œil, la rétine, et plus particulièrement dans les photorécepteurs rétiniens. Il existe deux types de photorécepteurs : (i) les bâtonnets, très sensibles à la lumière et responsables de la vision nocturne et (ii) les cônes, responsables de la vision diurne et chromatique. Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont indispensables à la fonction et à la survie des photorécepteurs.

L'Amaurose congénitale de Leber (ACL) est caractérisée par une dégénérescence très précoce des photorécepteurs associés à une perte de la vision dans l'enfance. A ce jour, des mutations dans plus de 17 gènes ont été associées à des ACL chez l'homme. Parmi ces mutations, celles touchant le gène Rpe65 représentent environ 2% des cas totaux d'ACL. Rpe65 est une enzyme exprimée au niveau des cellules de l'EPR. Elle est nécessaire à la synthèse du photo pigment des photorécepteurs. Un défaut de fonction de cette enzyme entraîne une perte importante de la vision nocturne puis diurne. Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace pour traiter les ACL liées à un défaut en Rpe65. Cette pathologie étant autosomique récessive, la thérapie génique d'addition, qui consiste en l'apport d'une copie supplémentaire du gène Rpe65 dans les rétines déficientes, est donc une approche thérapeutique intéressante. Afin de limiter les effets secondaires, d'améliorer le mode d'administration et de gagner en sélectivité nous souhaitons fonctionnaliser un vecteur AAV2 par une molécule chimique qui portera à son extrémité une fonction de reconnaissance spécifique du tissu rétinien que nous ciblerons (EPR). Le but est donc d'associer chimiquement un mannose par liaison covalente à un AAV2 et d'étudier ainsi le potentiel de l'association mannose-AAV2 (Chem-AAV) pour la transduction de cellules RPE après injection intra vitréenne. Dans un premier temps, les vecteurs Chem-AAV porteurs du gène rapporteur de la GFP seront injectés à des rats puis son expression dans les cellules RPE sera évaluée par des techniques d'immunofluorescence.

Afin de comparer la transduction des cellules de la rétine pigmentaire (RPE) par des vecteurs modifiés après injection intra-vitréenne (IVT) ou sub-rétinale (SR). L'étude sera effectuée avec des rats Spraguey Dawley CD), mâles, d'un âge 2 à 3 mois. Les deux yeux seront injectés par la même voie (IVT ou SR), mais un œil sera injecté avec le vecteur contrôle (AAV2 non modifié) et l'autre œil avec le vecteur modifié (AAV2-mannose). Les 2 modifications chimiques avec mannose ont été effectuées en couplant, soit 1000 équivalents (eq), soit 10 000 équivalents (eq) de mannose par particule AAV, deux vecteurs modifiés seront donc à tester.

L'étude sera composée de 4 groupes expérimentaux.

Groupe 1 : Injection IVT. AAV2 contrôle vs AAV2-Mannose-1 000eq

Groupe 2 : Injection IVT. AAV2 contrôle vs AAV2-Mannose-10 000eq.

Groupe 3 : Injection SR. AAV2 contrôle vs AAV2-Mannose-1 000eq

Groupe 4 : Injection SR. AAV2 contrôle vs AAV2-Mannose-10 000eq

Chaque groupe expérimental sera composé de 8 animaux (n= 36 au total, dont 4 supplémentaires).

Un suivi de fond œil non-invasif sera effectué de façon hebdomadaire sur 60 jours post-injection.

Après euthanasie, les prélèvements post-mortem des yeux (rétines) et du foie permettront d'évaluer la biodistribution des vecteurs ainsi qu'un prélèvement sanguin pour analyse.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée comme suit :

- Réduction

La constitution des groupes d'animaux permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Ce nombre d'animaux permettra une analyse statistique des résultats afin de conclure ou non à l'efficacité du vecteur étudié en comparaison aux contrôles.

Chaque animal est injecté en bilatéral (œil gauche injecté avec le vecteur contrôle) afin de réduire le nombre d'animaux.

- Raffinement

Le bien-être animal passera notamment par :

- de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu

- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)

- l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou euthanasie si pas d'autre alternative)

- Afin d'améliorer la réactivité du personnel technique animalier, une grille de scoring de la douleur est mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.

- la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions (anesthésie, analgésie si nécessaire en traitement post-opératoire).

6728. Un déséquilibre entre formation et résorption osseuses entraîne la fragilisation de l'os et la survenue de fractures, qui représentent la manifestation principale de l'ostéoporose. L'ostéoporose liée à l'anorexie mentale (AM) est un phénomène partiellement irréversible qui survient chez des patientes jeunes, et reste mal connue. Des études récentes plaident en faveur d'une implication des sirtuines (enzymes « sirt » régulant l'expression de certains gènes) dans la régulation de la masse osseuse. En particulier, sirt1 est connue comme étant un agent pro-ostéogénique et anti-adipogénique.

Objectif: Dans un modèle animal mimant l'AM, les résultats préliminaires *ex-vivo* ont montré une diminution de 80% de l'expression de *sirt1* dans les cellules stromales (CS) (cellules adhérentes de la moelle osseuse et progénitrices des ostéoblastes et adipocytes) issues des souris « anorexiques » par rapport aux CS issues des souris contrôles. L'objectif principal de ce projet est de déterminer si, dans un contexte physiopathologique (*in vivo*), *sirt1* peut représenter une cible thérapeutique pertinente pour la prise en charge de l'ostéoporose liée à l'AM.

Modèles animaux et méthodologie. Le modèle animal permettant de reproduire les effets de l'AM a été validé chez la souris femelle. Ce modèle (durée 8 semaines) est basé sur la restriction calorique (diminution de l'alimentation) couplée à la séparation des animaux (protocole SBA : Séparation Based Anorexia). Nous utiliserons des souris femelles C57BL6 âgées de 6 semaines. Au terme du protocole SBA, les CS de la moelle osseuse seront prélevés.

L'effet de la modification de l'activité de *sirt1* sur la formation osseuse sera étudié *ex-vivo* en cultivant des CS (cultures cellulaires) et des os (cultures organotypiques) prélevés chez les souris contrôles et les souris soumises au protocole SBA. Ces cultures se feront dans un milieu de co-différenciation et en présence d'un activateur ou d'un inhibiteur de *sirt1*. L'effet de *sirt1* sur le phénotype osseux sera alors étudié par différentes approches (biochimiques, moléculaires, tests fonctionnels).

L'approche expérimentale projetée ici est donc une approche *ex-vivo*. En effet il a été démontré que la restriction calorique augmente l'expression extra osseuse de *sirt1* par rapport à la moelle et par conséquent il est très difficile d'analyser l'effet spécifique de ces traitements de *sirt1* sur l'os *in vivo*.

Le nombre total d'animaux utilisés dans cette étude est égal à 102. Afin d'obtenir des résultats significatifs, 3 expériences identiques et successives seront envisagées. Chaque expérience sera réalisée sur 26 souris réparties en deux groupes : 12 souris SBA plus 12 souris témoins (CT), auxquelles on prévoit 2 souris supplémentaires (2 SBA) afin de pallier d'éventuels aléas expérimentaux. Le nombre total de souris prévues pour cette partie 1 du projet est donc de 78 souris. Afin de confirmer le rôle précis de *sirt1*, une quatrième expérience (partie 2 du projet) prévoit l'utilisation de souris KO pour *sirt1*. Pour cette expérience, 24 souris seront utilisées : 12 souris KO pour *sirt1* placées soit en protocole SBA 8 semaines (6 souris), soit contrôles (6 souris), et 12 souris du même fond génétique et non-KO pour *sirt1* : (6 souris) en SBA et 6 souris contrôles. La durée totale de ce projet est prévue sur deux ans.

Méthode de mise en œuvre pour le "Remplacement":

L'objectif du projet étant d'étudier les phénomènes intimement liés à la physiologie, aux balances hormonales, et aux boucles de régulation en réponse à la perte de poids corporel dans des conditions mimant les conséquences de l'anorexie mentale, il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par une autre approche pour répondre aux questions posées.

Méthode de mise en œuvre pour la "Réduction" :

Plusieurs échantillons déjà obtenus lors d'un précédent protocole seront réutilisés pour la réalisation de ce projet. Seuls sont prévus les animaux nécessaires pour générer de nouveaux échantillons ou de nouvelles approches.

Méthode de mise en œuvre pour le "Raffinement", atténuer la souffrance et améliorer le bien-être des animaux :

Les conditions d'hébergement comprennent un enrichissement du milieu à base de ouate compressée à effiloche. Les souris sont acclimatées à leur environnement avant toute intervention. Durant le protocole SBA, chaque animal est pesé et observé quotidiennement afin de déterminer s'il n'est pas dans une situation critique se manifestant par une prostration, des tremblements, des difficultés à s'alimenter. Si c'est le cas, l'animal reçoit un supplément d'alimentation et après 48h, si son état ne s'est pas amélioré, il est retiré de l'étude et mis à mort.

6729 L'hémophilie est une maladie hémorragique héréditaire caractérisée par un déficit ou dysfonctionnement en facteur de la coagulation. La maladie se manifeste par des saignements excessifs en cas de traumatismes parfois minimes, touchant notamment les articulations et les muscles. Il existe deux types majeurs d'hémophilie : selon que le facteur en cause est le facteur VIII (FVIII) ou le facteur IX (FIX), on parle d'hémophilie de type A ou B, respectivement. La prise en charge thérapeutique de l'hémophilie repose sur l'injection répétée du facteur de coagulation déficient d'origine plasmatique ou recombinant. Une difficulté majeure de ce traitement pour les patients et leur famille est donc le besoin fréquent d'injections qui s'élèvent à 3 injections par semaine en moyenne.

Aussi, prolonger la demi-vie des médicaments pour l'hémophilie réduirait donc fortement la fréquence des injections. En effet, une molécule active et efficace pendant 2 semaines aiderait significativement le confort et la qualité de vie des patients. Dans le cas de l'hémophilie-B, de nombreux travaux s'intéressent à ce critère de demi-vie du FIX en augmentant la taille de la molécule. Lors d'essais cliniques, de nouvelles molécules de FIX ont déjà montré un allongement de la demi-vie d'un facteur 5 en moyenne par rapport à la forme non-modifiée.

L'objectif scientifique de notre projet est de mesurer la demi-vie d'un nouveau FIX caractérisé dans notre laboratoire, c'est à dire de déterminer le temps après lequel la quantité circulante a diminué de moitié après l'injection. L'étude consiste à injecter la molécule par voie intraveineuse chez des rats non-hémophiles. A des temps précis suivant l'injection, des échantillons de sang seront prélevés sur chacun des rats. La quantité de FIX circulant sera alors déterminée et comparée à la demi-vie de FIX non-modifié, médicament injecté habituellement chez les patients. Après le dernier prélèvement de sang, les rats seront mis à mort.

Dans le but d'avoir les résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

1) Remplacement :

Le rat est le seul modèle pertinent pour les mesures de pharmacocinétique de molécules coagulantes car toujours représentatif de la demi-vie des FIX (modifiés ou non) observée chez l'homme par la suite en essais cliniques.

2) Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif de l'expérimentation qui est de définir la demi-vie d'une molécule sur 5 rats et de la comparer à celle définie pour la forme non-modifiée.

### 3) Raffinement

Le bien-être des animaux sera impérativement pris en compte à chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux notamment dans le domaine de l'hémostase. Ce projet couvre l'utilisation d'au maximum 15 rats pour une durée d'un an.

6730. *Xenopus laevis* (xénope) est un amphibien de laboratoire de vie aquatique utilisé dans des études de biologie cellulaire, biologie du développement, cellules souches, morphogénèse, réplication de l'ADN, et dans bien d'autres champs de recherche comme celui qui nous occupe : l'expression hétérologue de récepteurs et canaux ioniques du système nerveux humain pour leur caractérisation pharmacologique et la découverte de nouveaux ligands en vue de leur utilisation thérapeutique. C'est-à-dire, nous utiliserons l'ovocyte de xénope comme cellule hôte pour produire des protéines de membrane de préférence d'origine humaine. Ces protéines d'origine humaine (récepteurs et canaux ioniques) seront étudiées par électrophysiologie directement sur l'ovocyte de xénope.

Le projet comporte :

1) Entretien des animaux : Pour notre recherche, nous utilisons des xénopes femelles portant une puce électronique sous-cutanée permettant l'identification et le suivi de chaque animal. Les xénopes sont hébergés dans un laboratoire standard d'élevage de xénopes maintenu à une température constante de 21°C et exposés à un cycle de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Les xénopes sont élevés par groupes de six dans des bacs de 20 litres d'eau filtrée avec un filtre de charbon actif pour éliminer le chlore qui peut endommager la peau des amphibiens.

2) Extraction des ovocytes : Le xénope femelle en captivité produit de façon continue des milliers d'ovocytes dans leurs sacs ovariens. L'extraction d'ovocytes se fait par laparotomie sur amphibien anesthésié. Le xénope femelle opérée est mis en observation pendant 24 heures avant de réintégrer son bac de culture. Les xénopes femelles peuvent être opérés jusqu'à 6 fois avec un intervalle d'au moins 4 mois entre chaque opération ce qui réduit sensiblement le nombre d'animaux de laboratoire à utiliser (REDUCTION). Le nombre d'opérations, le poids et l'état général de chaque xénope est suivi individuellement grâce à la puce électronique (RAFFINEMENT). L'opération répétitive n'affecte ni le poids ni l'état général ni le comportement de l'amphibien. L'opération d'une xénope fournit des milliers d'ovocytes au stade de maturation V et VI compatibles avec des expériences d'électrophysiologie.

3) Expression hétérologue des récepteurs et canaux du système nerveux : Pour l'expression de récepteurs ou canaux ioniques d'origine humaine, les ovocytes sont microinjectés avec du matériel nucléaire (ARN messager ou ADN complémentaire codant pour un récepteur ou un canal ionique donné), ou avec des membranes biologiques riches en récepteurs ou canaux ioniques. Les gènes qui codent pour les récepteurs ou canaux ioniques de système nerveux sont de préférence d'origine humaine ou d'un vertébré comme la souris ou le rat, ou d'un invertébré comme des mollusques ou insectes. La liste n'est pas limitative. L'origine des membranes biologiques peut être l'organe électrique du poisson torpille et autres poissons électriques, des membranes du diaphragme de rongeurs (souris, rats), des membranes issues des biopsies du tissu musculaire ou du cerveau humain, ou des membranes issues de cultures cellulaires. La liste n'est pas limitative.

4) Electrophysiologie. Les ovocytes de xénope constituent un modèle électrophysiologique validé pour la caractérisation pharmacologique de récepteurs et canaux ioniques du système nerveux et l'étude du mode d'action de ligand naturels tels que des toxines ou de molécules de synthèse. Ce projet focalisé sur la pharmacologie des récepteurs et canaux ioniques ne fait pas appel à l'utilisation d'animaux vivants (REMPACEMENT). Nous utiliserons des xénopes comme donneur d'ovocytes.

L'utilisation d'ovocytes de xénope permet de nous affranchir de l'utilisation de modèles animaux afin d'étudier des récepteurs et canaux ioniques d'origine humaine (REMPACEMENT). En effet, l'ovocyte de xénope est capable de produire des protéines encodées par le matériel génétique micro-injecté dans l'ovocyte, de replier correctement lesdites protéines, et de placer à niveau de leur membrane plasmique les récepteurs ou canaux ioniques d'origine humaine que nous étudierons par électrophysiologie.

L'utilisation du modèle ovocyte de xénope nous servira à :

- Caractériser pharmacologiquement des récepteurs et canaux ioniques humains.
- Déterminer le mécanisme d'action d'une toxine donnée envers sa cible (récepteur/ ou canal ionique).
- Etudier les relations structure-activité entre le récepteur/canal ionique et leurs toxines ou ligands.
- Découvrir de nouvelles molécules naturelles bioactives.
- Diriger la synthèse de molécules organiques vers une activité voulu/souhaité.

L'utilisation du modèle ovocyte de xénope est vital pour que nous puissions atteindre notre objectif global qui est d'utiliser des neurotoxines d'origine naturelle comme source d'inspiration pour la conception de nouvelles drogues pour des diverses maladies et dysfonctionnements neurodégénératives où des récepteurs ou canaux ioniques sont impliqués.

Nous prévoyons de commander 12 xénopes par an. Le nombre d'animaux qui seront utilisés durant ce projet est de 60.

6731. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/5000 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X, résulte en une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché.

La thérapie génique est une des approches prometteuses pour le traitement de cette pathologie. L'efficacité thérapeutique passe par le transfert dans les muscles, à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique

qui est une copie miniaturisée du gène de la dystrophine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine « micro-dystrophine » fonctionnelle.

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

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

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

Les résultats attendus sont les suivants :

-Une expression de la protéine  $\mu$ dystrophine largement distribuée dans les muscles, cœur et le diaphragme, tissus cibles de la thérapie,

-Une correction/amélioration clinique des animaux.

Cette étude permettra également de documenter :

-La biodistribution et la dissémination du vecteur AAV dans les fluides biologiques des animaux injectés,

-La réponse immunitaire (humorale et cellulaire) contre la capsid de l'AAV et la protéine  $\mu$ dystrophine nouvellement synthétisée.

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

La constitution des groupes est basée sur notre expérience précédente, lors de laquelle nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats, sans qu'il soit excessif en terme de chiens GRMD à inclure. Aucune étude statistique n'est prévue dans ce projet.

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

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

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

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

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

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

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

6732. Le lait maternel est considéré comme l'aliment idéal pour le nouveau-né et sa qualité est déterminante pour la santé de l'individu à l'âge adulte (développement du système immunitaire, réduction des risques d'allergie, ...). Cette qualité est étroitement liée au développement de la glande mammaire qui en est la source. Des travaux montrent que ce développement est assujéti à des facteurs environnementaux, tels que l'alimentation qui, de ce fait, va impacter la qualité du lait.

La glande mammaire (GM) est un tissu complexe composé de différents types cellulaires. Elle possède une structure anatomique unique, qui évolue durant la vie de l'animal pour permettre pendant la lactation la synthèse et la sécrétion du lait, indispensable à la croissance du jeune. Les travaux conduits jusqu'à présent ont évalué l'impact du régime sur le développement et le fonctionnement du tissu mammaire en se focalisant majoritairement sur les périodes de gestation et de lactation. Peu de données sont en revanche disponibles en ce qui concerne la période de développement précoce de ce tissu (puberté), dont on sait qu'elle influence le potentiel laitier de l'animal. De même, les conséquences de perturbations alimentaires sur la cellule épithéliale mammaire (CEM), unité de production de lait et siège des principales régulations de l'organe restent à explorer.

L'épigénétique est définie comme l'étude des mécanismes modifiant de façon réversible l'expression des gènes sans modifier la séquence du génome, ce qui permet d'assurer une identité spécifique à chaque type cellulaire. Des modifications des marques épigénétiques d'un type cellulaire donné peuvent être induites lors de la différenciation cellulaire, lors du développement d'un organe ou encore être provoquées par l'environnement. Nous souhaitons étudier l'impact d'un régime de type « cafétéria », c'est-à-dire riche en lipides et en glucides (régime obésogène), sur la cellule épithéliale mammaire à la puberté et pendant la lactation. Nous avons choisi comme modèle animal le lapin parce qu'il présente l'avantage d'avoir une proximité physiologique (métabolisme lipidique) plus élevée avec la femme que d'autres modèles de laboratoire plus courants comme les rongeurs. De plus, cet animal d'intérêt agronomique est fréquemment utilisé comme modèle de choix pour l'étude de pathologies métaboliques humaines. Dans ce cadre, les glandes mammaires des lapines ayant reçu une alimentation riche en lipides et en glucides pendant la puberté seront comparées à celles d'animaux ayant reçu un régime normolipidique et normoglucidique (régime témoin). Cette comparaison utilisera des approches de transcriptomique et d'épigénétique et permettra de mettre en évidence des réseaux de gènes régulés par l'alimentation ainsi que des modifications dans la régulation épigénétique de ces gènes. Ce projet devrait contribuer à enrichir les recommandations

nutritionnelles données aux mères pour bénéficier à la santé des nouveau-nés. L'ensemble de ce protocole requiert l'utilisation de 40 lapines (10 lapines par groupe expérimental), car aucun modèle cellulaire ou *in vitro* ne peut reproduire les processus physiologiques aussi complexes que la puberté ou la lactation. Le schéma expérimental, réalisé en collaboration avec des biostatisticiens, nécessite pour obtenir des résultats ayant une signification statistique : 20 lapines soumises à une alimentation riche en lipides et en glucides et 20 autres soumises à un régime témoin. Les 12 mâles à maturité sexuelle serviront uniquement à l'accouplement. Dans chacun des groupes 10 lapines seront euthanasiées après la puberté et 10 durant la lactation. Des analgésiques seront utilisés lors des prélèvements sanguins sur animaux vigiles et une attention particulière (cages accolées permettant une communication visuelle et olfactive des animaux, cages à mezzanines) sera portée à l'enrichissement des conditions d'élevage des animaux durant l'ensemble des expérimentations.

6733. Le glyphosate est actuellement autorisé par l'Union Européenne et toujours très largement utilisés en France. Cependant, les informations actuellement disponibles sur ce pesticide, sous forme active seule ou sous formulation telle que disponible dans le commerce, sont clairement insuffisantes et ne permettent pas de définir une régulation claire sur l'utilisation de ce composé. Ainsi, il est considéré comme "agent cancérigène probable pour l'humain" depuis Mars 2015 par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de l'Organisation Mondiale de la Santé, alors que l'agence Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) estime au contraire que le glyphosate, dans les conditions actuelles d'utilisation et d'exposition, présente un danger cancérigène pour l'humain. Plus particulièrement, les effets potentiels de ce pesticide sur le développement et le fonctionnement du système nerveux central sont relativement peu étudiés. Par ailleurs, il est très surprenant de découvrir que les quelques études de toxicité du glyphosate sur le système nerveux central se sont focalisées sur les mâles, en délaissant complètement une influence potentielle sur les femelles. Notre projet a donc pour but de déterminer si le glyphosate, sous forme de composé actif (molécule seule) ou en formulation (pesticide en vente commerciale), a des effets sur le développement du système nerveux chez les vertébrés en utilisant le rat (*Sprague Dawley*) comme modèle animal. Notre but principal est de définir, chez le mâle et chez la femelle, en cours de développement :

1. l'influence de l'exposition périnatale au glyphosate, seul ou sous formulation, sur les comportements d'interaction sociales et sexuelles ;
2. l'influence de cette exposition sur la flore intestinale ;
3. l'influence de l'exposition périnatale à ce pesticide sur le développement du système nerveux central ; et enfin,
4. l'influence sur l'activité d'un enzyme, l'aromatase, impliqué dans la transformation de la testostérone en œstrogènes, enzyme présent au sein de l'appareil reproducteur mais également dans d'autres tissus comme le cerveau.

Des études préliminaires ont été réalisées sur cultures cellulaires afin de confirmer les effets du glyphosate, seul ou sous formulation commerciale, sur l'aromatase (Remplacement). Cependant, les études *in vivo* restent indispensables afin de définir les effets à long terme de ce pesticide sur le développement du système nerveux central, sur le comportement et sur la flore intestinale. Il est important de noter que ces différents paramètres ont une influence significative les uns sur les autres et que seules des études à l'échelle de l'organisme entier peuvent nous apporter une réponse précise sur l'effet potentiel du glyphosate. Un total de 21 ratte gestantes seront réparties en 3 groupes. 1. Groupe control ; 2. Groupe recevant du glyphosate sous forme de composé actif ; et 3. Groupe recevant du glyphosate sous formulation. Une dose de glyphosate de 50mg/kg/jour sera administrée journalièrement, sur base de la dose maximale sans effet nocif observable (NOAEL). Le traitement sera administré via un biscuit vanillé contenant le glyphosate ou son solvant durant la gestation et durant la l'allaitement, jusqu'au moment du sevrage. Ce type de traitement mime la situation normale chez les humains (ingestion orale de composés alimentaires contenant le pesticide) et surtout élimine le stress potentiel de l'administration par gavage ou injection chez la mère (Raffinement). Ces doses utilisées ne sont officiellement pas toxiques et ne provoquent pas de malformation chez les nouveau-nés. Dans le cas très improbable de souffrance d'un individu au cours de la procédure expérimentale, les mesures appropriées de réduction de la douleur seront employées. Nous estimons que nous obtiendrons et utiliserons 210 nouveau-nés, résultant de l'exposition périnatale des 21 mères. Tous les individus seront utilisés pour les différentes procédures, y compris certaines procédures comportementales d'interaction sociales avec des animaux stimulés (15 mâles et 25 femelles stimuli). Plus important, différents tissus (notamment gonades, foie, reins, intestins et cerveau) seront prélevés et analysés par différentes équipes afin de réduire au maximum le nombre d'exposition et donc d'animaux (Réduction). Comme indiqués plus hauts, ces études seront réalisées sur mâles et femelles, puisque de nombreuses études sur le développement du système nerveux et du système endocrinien et des effets des perturbateurs sur ce développement suggèrent, dans de nombreux cas, des différences sexuelles. En conclusion, notre étude utilisera un total de 271 rats (mères, descendance et stimuli sociaux) et devrait nous permettre de mieux définir les effets d'un composé très couramment utilisés par les professionnels (agriculture) mais aussi par les particuliers.

6734. Les études menées au sein du Centre, nous amènent périodiquement à devoir former et à entrainer notre personnel technique (vétérinaire, technicien animalier, ingénieur de recherche) à diverses méthodes d'administration de traitements au niveau du système nerveux central chez le rat. Ces formations se font en interne, avec l'assistance ou non d'un formateur extérieur disposant de l'autorisation d'expérimenter, sous la responsabilité du vétérinaire et du responsable des animaleries. Ces formations concernent des actes de degré moyen de sévérité : injections intracisternales chez le raton de 3 jours, utilisation de la technique de stéréotaxie pour réalisation d'injections intracérébrales chez le rat jeune adulte.

Dans le cadre de ces projets de formation interne pour une durée totale de 5 ans, nous estimons avoir besoin en moyenne de 10 rats (*Sprague Dawley*) par an, soit au maximum 50 rats sur 5 ans. L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée de la façon suivante :

Remplacement : afin d'atteindre les objectifs pédagogiques définis, l'animal est indispensable pour apprendre les gestes très spécifiques d'administration au niveau du système nerveux central.

Réduction :

- Le nombre minimum d'animaux est choisi en tenant compte du nombre nécessaire et suffisant à la mise en place de séances de formation adaptées pour une durée de 5 ans au sein de notre animalerie. Une moyenne de 10 rats sera nécessaire par an. Aucun test statistique ne sera réalisé dans ce projet étant donné qu'il s'agit ici de formation à des gestes techniques.

- Chaque session de formation regroupera dans la mesure du possible un maximum de personnes à former afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Raffinement :

Au cours de ce projet, le souci du bien-être animal passera notamment par :

- une période d'acclimatation d'au minimum 7 jours au sein de l'animalerie avant l'entrée des animaux adultes en "protocole".

- de bonnes conditions d'hébergement (soins, enrichissements du milieu)

- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)

- l'instauration de points limites pertinents et précoces

- la mise en place de mesures adaptées (anesthésie, analgésie si nécessaire : injection en sous cutanée de buprénorphine à 0.05 mg/kg ou euthanasie par des méthodes reconnues : paragraphe 3.3.3).

Le respect du bien-être animal au sein du Centre passe par des conditions d'hébergement adéquates, un suivi par observation biquotidienne des animaux, l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou euthanasie si pas d'autre alternative). Afin d'améliorer la réactivité du personnel technique animalier, une grille de scoring de la douleur est mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates. Cette grille est fournie en annexe à ce document de saisine.

6735. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires (environ 1/5000 naissances males). Elle est causée par un défaut dans le gène de la dystrophine, situé sur le chromosome X, résulte en une dégénérescence progressive du tissu musculaire. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle cardiaque et le diaphragme. Chez les patients DMD, la marche est définitivement perdue avant l'âge de 15 ans et le décès survient généralement avant 30 ans. Il n'existe pas de traitement curatif à ce jour sur le marché.

La thérapie génique est une des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie.

Avant le passage chez l'homme, l'efficacité thérapeutique des approches de thérapie génique est aujourd'hui validée à l'aide de deux modèles animaux : la souris mdx et le chien GRMD (pour Golden Retriever Muscular Dystrophy). Ces 2 modèles présentent cependant un certain nombre d'inconvénients :

-La souris mdx ne reproduit que partiellement les lésions tissulaires retrouvées chez les patients DMD et est relativement peu malade (espérance de vie équivalente à celle d'une souris saine).

-Le chien GRMD présente des lésions tissulaires proches et une évolution semblable à la maladie retrouvée chez les patients DMD, mais reste un modèle de gros animal coûteux et lourd à manipuler. Enfin, l'établissement de cohortes statistiquement significatives est quasi impossible.

En 2014, un consortium de laboratoires, dont fait partie notre équipe a généré un nouveau modèle animal de la DMD : le rat DMDmdx. Cette lignée de rat se révèle être un très bon reflet de la pathologie humaine et peut donc se substituer au modèle canin, au moins pour réaliser les 1ères phases d'évaluation de l'efficacité de nouveaux produits thérapeutiques.

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

Nous réalisons actuellement étude de recherche de dose thérapeutique, avec le produit AAV- $\mu$  dystrophine, chez le rat DMDmdx âgé de 2 mois.

Ce nouveau projet a pour but d'évaluer les effets d'une dose unique du vecteur thérapeutique après administration IV chez le rat DMDmdx à 2 stades d'évolution avancée de la maladie. En effet, la DMD étant une maladie évolutive et dégénérative, il est important de savoir si notre traitement de thérapie génique peut être efficace quel que soit le stade d'avancée de la maladie. La réponse à cette question aura des conséquences potentielles sur le design des essais cliniques prévus ensuite chez l'Homme (âge d'injection des patients).

L'étude est construite de façon à évaluer la capacité du vecteur administré en dose unique afin d'améliorer le phénotype DMD après administration d'animaux âgés de 4 et 6 mois.

La dose administrée sera la dose déterminée lors de l'étude précédente de recherche de dose thérapeutique et comme étant la dose efficace minimale et dose biologique optimale, à savoir  $1 \times 10^{14}$  vg/kg

Les groupes d'animaux seront répartis comme suit (total de 44 rats):

-Groupes expérimentaux : 1 groupe d'animaux pour chacun des stades de la maladie

◦6 rats DMDmdx âgés de 4 mois recevront le vecteur,  $1 \times 10^{14}$  vg/kg

◦6 rats DMDmdx âgés de 6 mois recevront le vecteur,  $1 \times 10^{14}$  vg/kg

◦6 rats DMDmdx âgés de 4 mois recevront le véhicule (solution de formulation du vecteur)

◦6 rats DMDmdx âgés de 6 mois recevront le véhicule

-Groupes contrôles recevront le véhicule :

◦6 rats sains (Sprague Dawley) âgés de 4 mois



◦ 6 rats sains âgés de 6 mois

Plus un groupe supplémentaire :

-Groupes contrôles « statut pathologique »

◦4 rats DMDmdx seront sacrifiés à l'âge de 4 mois

◦4 rats DMDmdx seront sacrifiés à l'âge de 6 mois

Ces 8 rats, non injectés, seront euthanasiés afin d'obtenir des tissus représentatifs du stade de la maladie à 4 et 6 mois et ainsi obtenir une analyse de la pathologie qui permettra de documenter l'état des lésions (muscles/cœur) à l'âge d'injection.

Les animaux des groupes expérimentaux et contrôles, seront suivis 3 mois post-injection.

Des analyses exhaustives seront réalisées chez tous les animaux afin d'évaluer l'efficacité du traitement à la fois au niveau histologique mais aussi phénotypique (évaluation de la force et de la fonction cardiaque).

Le nombre d'animaux par groupe est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Il a été approuvé suite à discussion avec la FDA (décembre 2015). Une analyse statistique sera réalisée, en utilisant des tests non paramétriques de type Kruskal-Wallis.

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en places en fonction des procédures expérimentales :

-Les injections IV du vecteur au niveau de la veine péniennne seront réalisées sous anesthésie, l'Etomidate (Hypnomidate®) en IP, précédée d'une prémédication analgésique (Buprénorphine (Vétergésic®), en avant injection de l'anesthésique en intra péritonéale, en SC).

Les prélèvements sanguins pré-injection seront effectués à cette occasion.

-Les échocardiographies 2D seront réalisées sous anesthésie (Etomidate en IP).

-Les tests d'évaluation de la force (Grip test), seront effectués sur animal vigile.

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

D'autre part les rats sont hébergés selon la réglementation en vigueur, avec un enrichissement de l'environnement

6736. De nombreuses études épidémiologiques ont montré que l'exposition à des toxiques de l'environnement comme des pesticides ou des répulsifs était responsable de troubles sur la santé humaine, en particulier du développement de cancer. Pour se développer, les tumeurs ont des besoins très conséquents de nutriments et d'oxygène, apportés par la circulation sanguine. Notre laboratoire a pu mettre en évidence l'effet de certains polluants persistants dans le développement de nouveaux vaisseaux sanguins sur des modèles de cellules vasculaires en culture. Le but de ce projet est :

- de confirmer les résultats obtenus sur des cellules et d'évaluer si les effets observés sont pertinents sur un animal entier
- d'observer l'occurrence de toxicité ou de cancers non reportés
- de distinguer la part due à l'exposition à des toxiques

Deux cent vingt souris Nude seront utilisées.

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

- Le traitement d'organismes intégrés par de faibles doses de toxiques à un caractère de stricte nécessité afin d'évaluer les effets au niveau des différents tissus et organes et ne peut pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information ;

- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum (n=10 par groupe) sans compromettre les objectifs du projet.

- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Nous développons en particulier un modèle de tumeurs par injection de cellules tumorales humaines à des souris immunodéprimées sur lequel nous évaluons la formation de nouveaux vaisseaux.

6737. Ce projet concerne l'efficacité de produits immunologiques destinés à protéger une espèce de carnivore domestique contre une maladie infectieuse virale.

La mise en œuvre de ce projet comporte une procédure expérimentale permettant d'évaluer l'efficacité de ce produit.

Cette procédure est conçue en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne et avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes expérimentales alternatives car elle répond à l'obligation réglementaire d'être conduite sur l'espèce de destination ;
- le nombre d'animaux envisagé par groupe sera déterminé en conformité avec la réglementation et dans le but d'obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 120 carnivores domestiques sera impliqué dans ce projet ;
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long de la procédure ;
- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux,
- un hébergement des animaux par groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement.

6738. Le lupus érythémateux systémique (LES) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique et une production pathogénique d'auto-anticorps et de complexes immuns aboutissant à la dégradation de certains organes (reins, rate). Notre projet de recherche innovant a pour but d'étudier l'efficacité anti-inflammatoire d'un nouvel anticorps thérapeutique contre cette pathologie *in vivo*. L'amélioration des signes cliniques dans une souche murine développant de manière spontanée un lupus (MRL Fas lpr/WT), permettra à court terme de valider l'effet thérapeutique de la molécule de manière préclinique et de déterminer la toxicologie de notre agent thérapeutique pour à plus long terme, valider son utilisation chez les patients lupiques.

Les expérimentations animales ne peuvent pas être remplacées par des expérimentations *in vitro*. L'efficacité anti-inflammatoire de molécules nécessite une première validation chez des souris lupiques avant de pouvoir être vérifiée chez l'homme. Dans le but d'obtenir des statistiques fiables, le nombre de souris sera réduit à 280, d'une part pour observer les signes cliniques du lupus au cours du temps et d'autres parts pour déterminer la concentration en molécule thérapeutique pour laquelle la physiopathologie est réduite voire inhibée sans être toxique pour l'animal. L'environnement des souris comportera divers enrichissements (roue, coton...).

6739. Pour maintenir l'homéostasie glucidique en dehors des périodes de repas, trois organes (le foie, les reins, et l'intestin) sont capables de produire du glucose dans la circulation sanguine. L'induction de la production intestinale de glucose (PIG) exerce des effets bénéfiques sur l'organisme. En effet, la détection du glucose produit par l'intestin dans la veine porte entraîne l'induction d'un signal nerveux (« glucose portal »), qui transmet au niveau central, entraîne l'activation d'aires cérébrales impliquées dans la régulation de l'homéostasie glucidique et énergétique. Une perfusion de glucose directement dans la veine porte permet de reproduire les effets bénéfiques de l'induction de la PIG et notamment l'induction de la satiété.

Le signal « glucose portal » active des zones du tronc cérébral telles que le noyau parabrachial (PBN) impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Celui-ci exprime les neurones à CGRP (Calcitonin gene-related peptide) dont l'activation se traduit par une diminution de la prise alimentaire.

Le but de cette étude est de déterminer si les effets bénéfiques de la perfusion de glucose en veine porte, notamment sur la prise alimentaire et le métabolisme glucidique sont retrouvés chez des souris génétiquement modifiées invalidées pour le gène cGRP (souris cGRP<sup>-/-</sup>).

Les souris cGRP<sup>-/-</sup> ne développent aucune modification physique ou de comportement par rapport aux souris contrôles, aucun signe de stress, ni de douleur n'a été observé au cours de leur développement.

Pour étudier l'effet du glucose au niveau de la région portale, nous utiliserons des perfusions directement en veine porte grâce à l'implantation préalable d'un cathéter réalisée sous anesthésie gazeuse (isofluorane). Tout sera mis en œuvre pour limiter la souffrance, la douleur et le stress de l'animal lors de cette chirurgie, par l'utilisation d'analgésiques et d'antalgiques au cours de la chirurgie et en post-opératoire pendant 3 jours.

Les souris seront hébergées en groupe de 4 souris dans un milieu enrichi permettant la nidation, avec accès libre à la nourriture et à l'eau. Les différents tests et prélèvements seront réalisés dans des conditions limitants le stress et la douleur des animaux. Le suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance.

Le nombre total d'animaux, soit 60 souris, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous effectuerons certains tests sur les mêmes souris, à une semaine d'intervalle entre chaque test.

La nécessité d'avoir recours à des animaux dans ce projet est d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire.

6740. L'utilisation de ressources locales telles que le tourteau de colza en alimentation porcine représente une alternative intéressante à l'utilisation de céréales et de tourteau de soja. Cependant, de telles matières premières ont une teneur élevée en fibres et peuvent faire varier la charge acide de l'aliment. Peu de travaux se sont attachés à étudier l'effet de ces caractéristiques alimentaires sur le métabolisme du phosphore et du calcium requis pour la croissance du squelette. L'objectif du travail est donc d'évaluer les conséquences de régimes enrichis en fibres et acidifiants sur le métabolisme minéral du porcelet.

Un total de 24 animaux sera utilisé pour l'expérimentation d'une durée de 30 jours. Ils recevront un des 4 traitements expérimentaux. Les animaux seront logés en cage individuelle pendant toute la durée de l'élevage permettant de suivre la consommation et de recueillir les urines et les fèces individuellement pour établir un bilan de digestibilité et de rétention du phosphore et du calcium. Une prise de sang au niveau de la veine jugulaire sera effectuée à jeun au 4ème jour pour évaluer le statut métabolique initial des porcelets (pH sanguin notamment).

Le 26ème jour, un cathéter sera posé à la veine auriculaire marginale. Des prélèvements de sang (4 ml à chaque point de la cinétique) seront ensuite réalisés au 27ème jour à intervalles de temps réguliers après le repas afin de suivre l'évolution des marqueurs sanguins de l'équilibre acido-basique et du statut minéral de l'animal. Le cathéter sera retiré dès les prélèvements réalisés.

Une pré-expérimentation incluant trois animaux sera réalisée pour affiner la procédure de pose de cathéter à la veine auriculaire marginale. Si des difficultés étaient rencontrées (problème post-opératoire, difficulté à la pose ou à l'échantillonnage), les animaux seraient finalement équipés d'un cathéter à la veine jugulaire.

Pour répondre au principe de remplacement, il est à noter que l'utilisation digestive et métabolique du phosphore et du calcium chez le porcelet fait intervenir un ensemble de mécanismes complexes. La construction d'un modèle mathématique ou *in vitro* pour prédire ces phénomènes n'est pas possible en raison d'un manque de données. Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou mathématique.

Pour répondre au principe de réduction, le nombre d'animaux utilisé pour les procédures expérimentales a été réduit à son minimum permettant néanmoins de montrer une différence significative entre traitement. Pour mettre en évidence une différence significative sur le critère de la digestibilité du phosphore, 6 animaux par régime seront utilisés. Une puissance de 90% a été choisie pour ce critère de façon à faire ressortir une différence même minime témoignant d'une modification du statut de l'animal.

Pour respecter le principe de raffinement et limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux, le milieu sera enrichi. Par ailleurs, si la pré-expérimentation était concluante, les animaux de la phase expérimentale seraient équipés d'un cathéter à la veine auriculaire marginale dont la procédure s'avère moins invasive que celle à la veine jugulaire. Dans les deux cas, une anesthésie générale adaptée sera pratiquée.

Toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite entrainera le retrait de l'animal.

6741. L'incidence des maladies métaboliques et inflammatoires liées au surpoids et à l'obésité ne cesse d'augmenter. Des adaptations du mode de vie, et notamment de l'alimentation (consommation de fibres alimentaires) peuvent contribuer à les réduire. Il existe un déterminisme très précoce (pendant la vie fœtale et la petite enfance) de ces pathologies. L'alimentation périnatale est ainsi susceptible de moduler la mise en place des fonctions tissulaires chez le jeune. Le microbiote, tant par sa diversité que par sa dynamique de colonisation précoce du tube digestif, représente un des acteurs de cette empreinte nutritionnelle.

Depuis quelques années, le concept d'ingrédients fonctionnels est apparu sur le marché de l'agroalimentaire. Ces ingrédients modulent certaines fonctions de l'organisme. La caractérisation plus précise de leurs effets sur la santé est un enjeu de la recherche en nutrition. Parmi ces ingrédients, on trouve les fibres prébiotiques : « ingrédients alimentaires non digestibles stimulant de manière sélective la multiplication et l'activité d'un nombre limité de groupes bactériens susceptibles d'améliorer la santé de l'hôte » qui montrent des effets bénéfiques intéressants chez les adultes les consommant régulièrement en intervenant notamment sur le microbiote intestinal (composition et métabolisme). Peu d'études se sont cependant intéressées aux effets de l'incorporation de ces fibres prébiotiques dans l'alimentation de la mère gestante et allaitante sur la santé du nouveau-né et les conséquences métabolique et immunitaire à long terme.

L'objectif du projet est donc de comprendre si des modifications périnatales de la trajectoire de développement et de maturation du système immunitaire et endocrine du tube digestif induites par la consommation de prébiotiques par la mère impactent les capacités d'adaptation de l'adulte en condition d'alimentation déséquilibrée.

En comparant deux groupes d'animaux dont les mères seront nourries avec un régime standard supplémenté ou non en fibres prébiotiques (n=10/groupe), nous pourrions mettre en évidence ces phénomènes de programmation précoce. Un challenge vaccinal chez le jeune et une alimentation déséquilibrée chez l'adulte seront utilisés pour étudier les effets de la supplémentation précoce en fibres prébiotiques sur le statut inflammatoire et métabolique de l'adulte. Vingt truies et leurs portées seront suivies (144 porcelets pour le challenge vaccinal et 24 porcs pour le challenge nutritionnel au stade adulte). Ces effectifs d'animaux sont calculés pour permettre une évaluation statistique des effets (réponses immunitaire et métabolique) attendus. S'intéressant à des réponses physiologiques, l'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable.

Le protocole a été élaboré dans le respect de la règle éthique des 3R : (1) Remplacer : le projet s'intéressant à des réponses physiologiques, l'utilisation d'un modèle animal vivant est indispensable. Le modèle animal choisi est le porcelet, pour sa ressemblance d'un point de vue anatomique et physiologique avec le nouveau-né humain ; (2) Réduire : les effectifs ont été fixés à minima pour permettre une évaluation statistiquement significative des effets attendus (réponses immunitaire et métabolique) ; (3) Raffiner : les compétences et expériences des expérimentateurs garantissent le respect du bien-être animal. Des points limites ont été établis, entraînant la sortie de protocole ou l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

6742. Les troubles dépressifs majeurs (TDM) sont des troubles mentaux fréquents, qui ont un retentissement majeur en termes de handicap, de qualité de vie, d'augmentation de la morbidité et de la mortalité (suicide) et de coût global pour la société. Les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS) et les inhibiteurs de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN) sont les deux classes de médicaments antidépresseurs les plus prescrites pour aux antidépresseurs. Bien qu'ayant montré leur efficacité, ces médicaments présentent un certain nombre d'inconvénients : inefficacité chez un tiers des patients, délai d'action trop long (1 mois), effets indésirables... Il y a donc un besoin de nouveaux médicaments dont l'action soit plus rapide, plus efficace et qui soient mieux tolérés. Récemment, il a été suggéré que le délai d'action des antidépresseurs pouvait être relié à un phénomène physiologique appelé la neurogenèse chez l'adulte, phénomène qui consiste en la production de nouveaux neurones, leur survie et leur maturation chez l'adulte à partir de cellules souches. Bien qu'étudié depuis dix ans, notamment chez des animaux naïfs, de nombreuses questions restent en suspens sur ce phénomène de neurogenèse et notamment dans les modèles d'anxiété/dépression murins. Par quels mécanismes les antidépresseurs ont-ils des effets sur la neurogenèse hippocampique ? Quel(s) rôle(s) joue(nt) ce phénomène dans l'action pharmacologique des antidépresseurs ?

Récemment, un nouveau modèle d'anxiété/dépression a été développé au laboratoire, il est basé sur l'élévation des concentrations en glucocorticoïdes (modèle CORT). Les animaux recevant ce traitement sur une période de 4 semaines ont mis en évidence un phénotype anxio-dépressif dans les tests comportementaux prédictifs d'une activité anxiolytique et/ou antidépresseive et une amélioration comportementale dans ces mêmes tests suite à un traitement par des antidépresseurs. Dans la mesure où l'hippocampe est responsable également des processus de mémoire et d'apprentissage, il sera intéressant d'évaluer les probables conséquences cognitives dans le modèle CORT. De la même manière un traitement chronique par un antidépresseur sera testé pour évaluer si ces déficits peuvent être corrigés par un tel traitement.

Enfin, de nouvelles classes d'antidépresseurs émergent qu'ils soient en développement ou sur le marché, l'étude préclinique de ces molécules est nécessaire afin d'en évaluer les effets de type anxio-dépressifs ainsi que cognitif du point dans le modèle CORT qui

présente l'avantage d'être un modèle animal très robuste et extrêmement reproductible. Parmi ces molécules dix seront testées dans cette étude grâce à des partenariats industriels.

L'évaluation de systèmes cérébraux impliqués dans des processus aussi complexes que les troubles de l'humeur requierent de l'expérimentation *in vivo*. Pour l'ensemble de ce projet, 3500 souris seront utilisées.

Ce nombre d'animaux prend en compte la règle dite des 3R. Il s'agit de réduire le nombre d'animaux de raffiner la qualité des expériences et de remplacer si possible l'expérimentation animale. Dans l'état actuel des connaissances modéliser *in vitro* ou *in silico* des troubles de l'humeur n'est pas possible. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire pour étudier ces pathologies. L'ensemble du projet aura cœur de conserver les animaux dans un état de confort optimal et pour ce faire des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés dès que nécessaire. Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum qui permette de s'assurer de la validité scientifique des données obtenues.

Ce projet permettra non seulement de mieux comprendre les mécanismes d'action des antidépresseurs, mais aussi de d'évaluer les nouvelles thérapies envisagées pour traitement de la dépression.

6743 Une modification de la perfusion sanguine du placenta peut s'accompagner d'un retard de croissance intra-utérin (RCIU). Celui-ci complique environ 10% des grossesses et entraîne une morbidité néonatale plus élevée que chez les fœtus de poids normal à terme. Il est difficile de détecter un dysfonctionnement placentaire précoce avec les outils d'imagerie diagnostique actuellement disponible en pratique clinique (par exemple, l'échographie Doppler). Récemment, nous avons démontré que l'échographie de contraste est un outil efficace permettant de quantifier plus précisément la perfusion placentaire à différents stades de gestation chez la rate. Nous souhaitons confirmer ces résultats par une étude longitudinale de la gestation physiologique par échographie de contraste sur 10 rates. Il est vraisemblable que des modifications de la perfusion placentaire puissent être visualisées très tôt dans la grossesse.

Afin d'étudier la dysfonction placentaire dans des conditions pathologiques nous sommes contraints de mettre en place un modèle animal. Ce modèle consiste à ligaturer une des deux artères utérines au 17ème jour de gestation, ce qui provoquera une baisse du débit sanguin placentaire et donc une hypoxie. L'avantage de ligaturer une seule des artères, nous permettra d'utiliser le côté controlatéral du même animal comme témoin. L'échographie de contraste se fera au 19ème jour de la gestation afin de quantifier la perfusion placentaire. L'objectif est de comparer la perfusion placentaire entre les placentas des deux cornes utérines. Pour cela, nous prévoyons de réaliser cette procédure sur 20 rates gestantes. Le modèle de RCIU est bien connu de notre équipe et déjà réalisé au cours d'expérimentations précédentes.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

Remplacement : Nous étudions la physiopathologie du RCIU. Par conséquent, à cette étape du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un autre modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*. Par ailleurs, l'utilisation des agents de contraste échographiques ne sont pas autorisés en pratique courante chez la femme enceinte. Des données complémentaires sont nécessaires afin d'établir leur innocuité. L'ensemble de ces manipulations comportent des procédures d'analyse histologique afin d'étayer les données de sécurité des agents de contraste.

Réduction : Un nombre total de 30 rates est nécessaire pour obtenir une quantification et tenir compte des variabilités de la mesure. Dix rates seront étudiées dans le cadre de la gestation physiologique puis 20 rates dans le cadre de la mise en place d'un modèle pathologique de RCIU. Le nombre restreint d'animaux examinés permettra de mettre en évidence la faisabilité de notre approche en montrant qu'une corrélation existe entre les paramètres ultrasonores utilisés et l'analyse histopathologique des tissus. Selon les résultats obtenus, une étude de plus grande ampleur pourra ultérieurement être mise en place.

Raffinement : Les rates seront hébergées par deux en présence d'un objet d'enrichissement (morceaux de carton). Les animaux avec un RCIU seront observés deux fois par jour et toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'euthanasie des animaux par le personnel qualifié.

6744. L'exposition du cerveau au stade périnatal à des toxiques, à une inflammation ou à une infection peut altérer le développement cérébral et ainsi être à l'origine de déficiences motrices, intellectuelles et sensorielles durables. En France, près de 1 % des enfants de 7 à 8 ans sont porteurs de déficiences sévères. Selon l'expertise « Déficiences et handicaps d'origine périnatale » réalisée par l'INSERM (2004), 50% de ces handicaps ont une origine périnatale (hypoxie-ischémie du nourrisson, pré-éclampsie...). Il n'existe actuellement aucun traitement pharmacologique permettant de restaurer ces fonctions cérébrales ou de limiter les atteintes centrales. À l'état physiologique, le cerveau est protégé des toxiques circulants dans le sang par plusieurs barrières appelées « interfaces sang-cerveau ». Les mécanismes de neuroprotection présents au niveau de ces interfaces au stade périnatal diffèrent de ceux présents chez l'adulte, mais sont encore mal définis.

Au cours des pathologies périnatales, les barrières sang-cerveau peuvent être altérées : le cerveau est alors exposé directement aux toxiques sanguins ce qui participe à l'apparition de déficiences cérébrales chez l'enfant.

Enfin, les interfaces sang-cerveau empêchent un grand nombre de médicaments d'atteindre le cerveau chez l'adulte. Cependant, la pharmacocinétique cérébrale de nombreux médicaments du système nerveux central (SNC) n'est pas connue chez le nouveau-né ou l'enfant.

Objectifs :

Appliquer les techniques de mesure de perméabilité sang-cerveau chez le rat à l'animal en développement pour :

1. Evaluer l'altération des interfaces sang-cerveau au cours des pathologies périnatales et tester l'efficacité de composés pharmacologiques pour restaurer ou renforcer la neuroprotection assurée par ces interfaces sang-cerveau.

2. Evaluer le passage cérébral de molécules pharmaceutiques dans le contexte d'un usage périnatal et pédiatrique. Les informations générées permettront d'améliorer les données disponibles sur l'usage de médicaments au sein de la population pédiatrique en réponse au règlement pédiatrique européen n°1901/2006 visant à élargir l'offre thérapeutique en pédiatrie.

Modèle d'étude :

- Le passage cérébral de molécules « traceurs » (marqueurs d'intégrité des interfaces sang-cerveau) et de médicaments sera évalué *in vivo* chez le rat en développement anesthésié (sans réveil) après administration en périphérie.

- Deux pathologies périnatales, la jaunisse pathologique du nourrisson et l'infection bactérienne, seront étudiées. Une souche de rat (Gunn) spontanément hyperbilirubinémique permettra de modéliser la jaunisse du nourrisson. L'infection bactérienne sera modélisée par administration d'un composant de paroi bactérienne (Pam) qui induit une inflammation similaire à celle produite au cours de l'infection.

- L'efficacité de composés pharmacologiques à renforcer la neuroprotection sera testée en prétraitant les animaux avant les mesures de passage cérébral. Trois agents pharmacologiques utilisés en clinique et connus pour activer différentes voies d'induction seront testés : le N-acétyl-cystéine, le diméthylfumarate et le phénobarbital.

Remplacement :

- Il n'existe pas de modèles cellulaires des interfaces sang-cerveau spécifiques de différents stades de développement. Il n'est donc actuellement pas possible de modéliser ces interfaces au stade périnatal *in vitro* ou *in silico*.

- La concentration intracérébrale d'un médicament dépend des caractéristiques des interfaces sang-cerveau mais aussi du métabolisme (rénal, hépatique, cérébral) du médicament, du flux sanguin et du turnover du LCR. La résultante de ces facteurs n'est pas appréhendable *in vitro*.

Réduction :

- Nous limiterons le nombre d'animaux en réalisant les expérimentations sur des animaux issus d'une même portée lors de comparaisons de groupes afin de limiter les variations interindividuelles (« litter-based method »).

Raffinement :

- Nous veillerons à limiter le mal-être des animaux : les femelles avec leurs portées seront placés dans des cages transparentes à environnement enrichi (papier, coton, carton) avec un accès permanent à l'eau et à la nourriture (portoir ventilé, cycle jour/nuit de 12h, température contrôlée).

- Les 2 modèles animaux proposés ne sont pas dommageables :

- Les rats Gunn présentent une hyperbilirubinémie modérée qui est indolore et qui n'a pas d'impact sur l'espérance de vie des rats.
- Le modèle Pam ne mime pas une réelle infection bactérienne mais permet de modéliser l'inflammation qui en résulte et qui est suffisante pour induire un dysfonctionnement des interfaces sang-cerveau. Aux doses utilisées, le Pam n'induit pas d'augmentation de la morbidité et de la mortalité.

- Toutes les mesures de passage cérébral seront réalisées sous anesthésie et suivies d'une euthanasie terminale.

- Après traitement (molécules neuroprotectrices, Pam), les rats seront replacés avec la rate. Le comportement maternel et la reprise de l'allaitement seront surveillés.

Nombre d'animaux :

819 animaux seront utilisés au cours de cette étude, soit 63 femelles avec leurs portées (12 rats/portée).

6745. Nous avons identifié par le passé que le lipide biologique, acide lysophosphatidique (LPA), son récepteur LPA1 et une protéine naturelle Autotaxine qui produit le LPA stimulent la croissance et l'invasion tumorale. Le projet consiste à évaluer chez la souris l'efficacité anti-tumorale et anti-métastatique de nouvelles molécules ciblant le récepteur LPA1 et l'Autotaxine sur la régulation de la croissance de la tumeur mammaire primaire ainsi que sur le déroulement des étapes précoces de la dissémination métastatique des cellules tumorales de cancer du sein. Les règles d'expérimentation seront assurées comme suit :

1- Remplacement : L'emploi des modèles animaux est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire *in vitro* la complexité physiologique des échanges entre les nombreux types cellulaires responsables de la dissémination métastatique.

2- Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum (12 souris, protocoles court et long) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 144 souris sera donc nécessaire.

3- Raffinement : Les souris seront tout d'abord placées en stabulation durant une semaine avant le début du protocole au sein de l'animalerie d'accueil. Elles cohabiteront par groupe de cinq dans un environnement enrichi (maison rouge, coton) sous surveillance quotidienne. Tout élément rentrant en contact avec la souris sera stérile : nourriture et litière sont irradiées, grilles, cages et biberons seront autoclavés. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. Le change de la litière et de la cage s'effectuera une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Lors de l'injection des cellules tumorales les souris seront anesthésiées. Elles seront traitées par la buprénorphine ou tout autre soin local, réhydratation nécessaires dans le cas d'apparition de signes de douleur ou de mal être. Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant une exploitation maximale par des analyses histologiques des données issues de l'expérimentation chez l'animal.

6746. En France, 1 nouveau-né sur 20 000 souffre d'une malformation congénitale d'un membre, ce dernier étant absent ou incomplet.

D'autres malformations, plus graves et handicapantes, peuvent affecter le visage, de façon plus ou moins étendue.

A ce jour, aucune greffe de membre ou de visage n'est pratiquée chez ces enfants car l'anomalie n'induit aucun risque vital pour eux tandis que le traitement anti-rejet nécessaire en cas de greffe est un traitement lourd, diminuant l'espérance de vie.

Afin d'améliorer la situation de ces patients, notre équipe de recherche étudie les mécanismes de rejet suite à une greffe de tissu composite (comprenant la peau, mais aussi le tissu sous-cutané, des muscles, des nerfs, des artères, et de l'os), chez le Porcelet nouveau-né, et envisage la mise au point d'un protocole induisant une tolérance à la greffe, qui rendrait le traitement immunosuppresseur à vie inutile.

Le porcelet nouveau-né est le modèle non primate qui se rapproche le plus de l'Humain, notamment au niveau de l'anatomie du système vasculaire.

Le projet utilisera au maximum 90 porcelets. Ce nombre pourra être réduit à 30 animaux en fonction des résultats obtenus.

Le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum permettant d'obtenir des résultats interprétables, et la réalisation de tests statistiques.

Durant tout le projet, tout sera mis en œuvre afin d'assurer un confort optimal aux animaux, conformément aux besoins de l'espèce (présence de la mère, lampes chauffantes, caillebotis souple).

Le principal bénéfice attendu est la réalisation de greffes chez les nouveau-nés sans qu'il soit nécessaire ensuite de prendre un traitement à vie.

6747. Les lagomorphes sont des animaux très sensibles. Toutes sortes de stress, y compris alimentaires, favorisent le développement d'affections, dont beaucoup se révèlent mortelles en l'absence de soins. Même s'il est difficile de chiffrer précisément la prévalence de la pathologie digestive en élevage rationnel en France à ce jour, les affections digestives constituent la cause essentielle de la morbidité et de la mortalité, chez le lapin de chair en croissance.

L'objectif de ce projet est de tester un nouvel additif permettant de diminuer la prévalence de telles affections. L'effet de l'additif testé (un probiotique) n'a jamais été étudié chez le lapin. Dans ce cas, il est indispensable d'évaluer cet effet sur l'état de santé des lapins ainsi que sur leurs performances de croissance.

La procédure visera donc à évaluer de manière très fine et régulière l'état de santé de 120 lapins ainsi que leurs performances de croissance (poids, consommation alimentaire individuelle). Les 120 animaux seront placés dans des logements individuels mais les lapins ne seront pas isolés ; ils peuvent se voir et se sentir. Ce dispositif permet la mesure de la consommation alimentaire individuelle et donc un calcul plus précis des performances de croissance des animaux comparativement à ce qui peut être fait en logement collectif. Ce dispositif individuel permet de diminuer le nombre d'animaux mis en essai, en étant très précis dans les mesures. Des points limite pour atténuer la douleur et la souffrance des lapins sont définis et appliqués strictement.

A la fin de l'essai, les 60 animaux qui ont reçu l'additif non autorisé seront euthanasiés car ils ne seront pas commercialisables dans les circuits de distribution et les autres pourront être intégrés dans un circuit de consommation.

6748. Les virus Influenza A sont responsables d'infections dans de nombreuses espèces animales, dont l'homme. Les virus influenza A causent chez l'homme une affection respiratoire aiguë accompagnée de signes généraux, appelée grippe. La gravité de l'infection dépend du statut immunitaire de l'hôte infecté. Ainsi les symptômes sont plus sévères et la mortalité est plus élevée chez les personnes immunodéprimées. Par conséquent les personnes âgées sont les principales victimes de la grippe due aux virus dits saisonniers, qui sont ceux qui circulent habituellement en hiver dans l'hémisphère nord et l'autre moitié de l'année dans l'hémisphère sud. Le rôle du statut immunitaire est également illustré par la nécessité de mettre à jour les vaccins de façon périodique pour faire face à la dérive antigénique des virus qui accumulent des mutations dans leur génome, permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Enfin, l'introduction d'un nouveau virus contre lequel la population humaine n'est pas immunisée est responsable d'infections plus graves, associées à une mortalité plus forte dans la population générale et également à une diffusion géographique mondiale. On parle alors de pandémie.

La vaccination ne suffit pas à protéger la population lorsqu'il existe une discordance entre les souches vaccinales et les souches circulantes. Il existe des molécules antivirales ciblant l'activité enzymatique de la neuraminidase virale, malheureusement la capacité évolutive intrinsèque des virus Influenza A conduit rapidement à l'apparition de mutants résistants à ces antiviraux. Il convient donc de réaliser des recherches pour identifier des traitements antiviraux complémentaires.

Le but de ce projet est de tester les propriétés antivirales de la molécule Sephin 1, récemment identifiée comme un inhibiteur spécifique de GADD34, une protéine de l'hôte. Des expériences récentes réalisées au laboratoire montrent que la Sephin 1 inhibe la réplication du virus Influenza en culture cellulaire et nous souhaitons donc maintenant évaluer son pouvoir antiviral *in vivo* dans un modèle animal.

Nous allons tester l'effet antiviral de la molécule Sephin 1 contre deux virus et nous allons utiliser deux lots de 79 souris, soit au total 158 souris.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;
- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des souris) sans restriction ;
- Manipulation des souris sous une hotte prévue à cet effet par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique quotidien par le vétérinaire responsable de l'essai

6749. Ce projet s'inscrit dans une étude globale s'intéressant à la perception de stimuli visuels chez l'étourneau *sansonnet Sturnus vulgaris*. Cette étape vise à déterminer quel peut être l'impact de l'angle de vue de stimuli visuels sur leur perception et sur le comportement des étourneaux. Les résultats obtenus au cours de cette étude permettront de conclure quant à l'effet a) du contexte, correspondant à des conditions artificielles, car les animaux seront placés en cage individuelle ; et b) du type de support de diffusion des stimuli visuels qui sera un écran LCD, sur la perception et la reconnaissance des stimuli visuels diffusés. Nous respecterons les 3R : « Remplacer » : l'étude portant sur la perception visuelle des étourneaux, nous ne pouvons donc pas remplacer le modèle animal choisi ; « Réduire » : seuls 12 étourneaux seront utilisés dans cette expérience, ce qui correspond au minimum statistique requis ; « Raffiner » : nous utiliserons la meilleure méthode expérimentale pour notre étude, cette méthode étant non invasive pour les oiseaux.

6750. Le développement d'une stratégie vaccinale dans le traitement de certains cancers semble être une approche thérapeutique prometteuse. Cependant, dans le contexte actuel, aucun vaccin n'a prouvé son efficacité en clinique. Partant de ce constat, il semble nécessaire de définir de nouveaux antigènes pouvant être mieux adaptés à une utilisation thérapeutique. Pour cette raison, nous avons précédemment mis en évidence que les Pioneer translation products (PTPs) possèdent les propriétés nécessaires pour être des substrats peptidiques antigéniques et pourraient donc agir comme des antigènes pour le développement d'une stratégie vaccinale. De plus, l'identification de composés permettant de stimuler et d'améliorer la réponse immunitaire contre ces peptides antigéniques est indispensable pour obtenir une réponse vaccinale efficace et sur la durée. Dans ce cadre nous avons identifié plusieurs composés capables d'améliorer la présentation antigénique des cellules tumorales telle que la cisplatine, l'étoposide, l'isoginkgetin, la madrasin et leurs dérivés.

Dans cet objectif, nous souhaitons améliorer la compréhension des mécanismes de production de ces PTPs dans un contexte tumoral ainsi que leur utilisation en combinaison avec des composés stimulateurs de la réponse immunitaire pour le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique.

Ce nombre estimé de souris pour ce projet est au maximum de 5814. Ce nombre d'animaux se justifie par la diversité des modèles de cancers, les différentes combinaisons de PTPs thérapeutiques et les molécules associées, l'étude des réponses immunitaires liées à l'utilisation de ces PTPs, ainsi que les différentes voies de signalisation mises en jeu. L'utilisation d'animaux vivants pour ce projet est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, l'immunité et l'effet des thérapies et vaccinations thérapeutiques sur la réponse anti-tumorale. Egalement, l'utilisation d'un organisme entier est indispensable pour étudier les relations entre ces traitements et les cellules immunitaires dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*.

Les groupes seront constitués d'un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au minimum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les tumeurs seront mesurées tous les 2-3 jours. La surveillance clinique des animaux sera quotidienne. La surveillance des souris porteuses de tumeur sera renforcée lorsque la taille des tumeurs approchera la taille maximale ou en cas d'apparition de lésion au site tumoral. Ainsi, seront régulièrement observés le changement dans l'aspect physique, le poids corporel, l'ingestion et le comportement (isolement, prostration ou manque d'hygiène) afin de prévenir la souffrance possible des souris. Afin de réduire au maximum le nombre de souris nous optimiserons l'acquisition des données pour chaque souris : croissance tumorale, prélèvement de sang et des organes. Les prélèvements sub-mandibulaires seront réalisés après anesthésie sous isoflurane et seront fait selon l'état de l'art.

6751. Les progrès thérapeutiques en oncologie ont permis d'obtenir une amélioration considérable des patients atteints d'un cancer localisé. Néanmoins, l'apparition d'une métastase représente toujours un tournant évolutif dans la maladie avec mise en jeu du pronostic. L'os est le troisième site métastatique par ordre de fréquence. Les métastases osseuses s'accompagnent d'un enjeu local important avec des douleurs et des fractures pathologiques responsables d'une altération de la qualité de vie et d'une importante morbidité. Jusqu'à présent, l'évaluation, par le médecin, du risque fracturaire d'une métastase osseuse reste très empirique et aléatoire. En revanche, interrompre à tort le traitement oncologique pour réaliser une prise en charge chirurgicale locale est source de retard dans la prise en charge oncologique et peut s'apparenter à une perte de chance. On estime qu'actuellement, sur la base de la radiographie simple et du scanner osseux, une intervention chirurgicale inutile a été réalisée pour > 80% des cas. Cette mauvaise sensibilité et de spécificité dans la prise de décision vient en partie du manque de finesse des critères actuellement disponibles soulignant que la simple lyse osseuse n'est pas la seule cause de l'augmentation du risque de fracture mais qu'elle est à replacer au sein de l'architecture osseuse, des contraintes mécaniques, de la nature tumorale et de la qualité de la matrice osseuse. Bien évaluer le risque fracturaire et déclencher une opération à bon escient représente donc un enjeu capital dans la prise en charge des patients.

Nos travaux préliminaires réalisés chez la souris injectée avec des cellules de tumeurs mammaires qui développent des métastases osseuses lytiques montrent qu'en plus d'une diminution de la masse osseuse, le tissu osseux restant présente une phase minérale moins mature que celle des animaux contrôles. Nous avons aussi établi auparavant que la maturité minérale était corrélée chez l'Homme et la souris avec sa résistance à la fracture. Afin de pouvoir prédire la survenue d'une fracture en présence de métastases osseuses nous devons donc connaître l'impact relatif de la lyse osseuse et des changements de composition dans la fragilisation de l'os.

Notre but premier est de comprendre la cinétique de la dégradation des propriétés mécaniques squelettiques (résistance au chargement et à la fracture) lors du développement métastatique et d'en identifier les prédicteurs. De plus, ces résultats nous

permettront de développer et valider un modèle de simulation non invasif de l'évolution du risque de fracture dans le contexte oncologique. Nous proposons ici d'analyser l'impact du développement des métastases osseuses sur la microarchitecture, la composition et les propriétés mécaniques de l'os à deux périodes après l'inoculation de cellules humaines d'adénocarcinomes mammaire et pulmonaires. Ces modèles animaux développent des métastases osseuses lytiques. Nous utiliserons une approche multimodale combinant imagerie *in vivo* (tomographie quantitative à rayons-X), caractérisation physicochimique (Spectroscopie infrarouge) et essais mécaniques *ex vivo*. L'intégration de ces données densitométriques, morphométriques et mécaniques devrait nous permettre de mieux comprendre les origines de l'augmentation du risque de fracture associée aux métastases osseuses.

**Raffinement :** Les règles d'expérimentation seront comme définies comme suit : Les souris seront tout d'abord placées en stabulation durant une semaine avant le début du protocole, au sein de l'animalerie d'accueil. Elles cohabitent par groupe de cinq dans un environnement enrichi, sous surveillance journalière. Tout élément rentrant en contact avec la souris est stérile : nourriture et litière sont irradiées, grilles, cages et biberons sont autoclavés. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière et de la cage s'effectue une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Lors de l'injection des cellules tumorales, les souris seront anesthésiées. Afin de diminuer le nombre de procédures par animal et d'affiner la durée du protocole, deux protocoles pilotes seront réalisées. **Remplacement :** Les expériences préliminaires réalisées chez la souris avec un modèle de développement de métastases de carcinome mammaire humain justifient d'utiliser ce même modèle dans le présent projet et d'élargir nos investigations à d'autres cancers à tropisme osseux, comme le cancer du poumon. **Réduction :** Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et le nombre d'intervention, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum (30 souris par type de lignée cellulaire) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables en fin d'expérimentation. 28 animaux seront nécessaires à la réalisation des protocoles pilotes pour le cancer du poumon. Un nombre total de 118 souris sera donc nécessaire.

6752. Le Cancer de la prostate est la première cause de décès par cancer chez l'homme. Des résistances aux traitements se mettent en place systématiquement et de nouvelles approches thérapeutiques sont donc nécessaires pour combattre les formes avancées de la maladie. Dans notre laboratoire, nous travaillons sur de nouvelles thérapies qui ciblent le métabolisme de la cellule cancéreuse. Après avoir testé nos molécules d'intérêt sur des cellules en culture, nous avons besoin de connaître leur efficacité dans un modèle animal. L'objectif de cette étude est de caractériser le mode d'action de nos agents dans un modèle *in vivo* intégré. Nos agents potentiellement anti-cancéreux, qui ciblent le métabolisme de la cellule, seront utilisés dans des souris génétiquement modifiées qui développent un cancer de la prostate, et dans des souris chez lesquelles nous aurons greffé des cellules cancéreuses humaines. Il n'existe pas de modèle animal parfait pour le cancer de la prostate, ceci nous oblige à réaliser des expériences dans deux modèles différents (TRAMP et Xénogreffes chez la nude) afin de valider nos conclusions. Pour ce projet, nous utiliserons 504 animaux maximum. Ce nombre a été calculé précisément pour limiter l'utilisation des animaux tout en ayant des résultats statistiquement fiables. Après avoir testé ces molécules *in vitro*, le remplacement est ici impossible car il est nécessaire d'utiliser des animaux afin d'obtenir les effets des molécules dans un système intégré. Au niveau du raffinement, tous les animaux utilisés seront manipulés le plus calmement possible et hébergés dans les meilleures conditions possibles avec un igloo et des tiges de coton afin de limiter au maximum leur stress. Afin de limiter au maximum la souffrance nous avons établi un suivi rigoureux de l'état de santé de nos souris et il sera mis fin à l'expérience dès les premiers signes de souffrance. Nous avons établi des points limites pour chaque procédure afin de limiter la souffrance des animaux et nous utiliserons du Ketoprofène comme analgésique en cas de douleur. Il est également important de noter que toutes les personnes participant au projet sont habilitées à travailler avec des animaux de laboratoire. Grâce à cette étude nous identifierons les cibles moléculaires et cellulaires de nos agents dans un contexte physiologique. Les résultats obtenus permettront de déterminer si nos agents peuvent passer en phase clinique et avoir un intérêt thérapeutique chez l'homme. L'analyse statistique des résultats utilisera les tests de Mann et Whitney et Anova.

6753. Il est admis que la rigidité artérielle est un puissant marqueur de risque cardio-vasculaire, en particulier dans les populations de patients âgés, diabétiques, hypertendus, insuffisants rénaux, personnes présentant un syndrome métabolique. Les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant au développement de cette rigidité ne sont pas encore totalement élucidés.

Notre équipe a déjà mené plusieurs études démontrant un lien existant entre le niveau d'inflammation local des parois de l'aorte thoracique (plus particulièrement au niveau de l'aorte ascendante) et le niveau de rigidité artérielle. Cette relation persiste chez des sujets âgés pouvant faire suspecter une implication particulière de cette zone dans le vieillissement artériel et cardiaque.

D'autre part, nous avons démontré que dans certains modèles animaux de syndrome métabolique en fin de vie (80 semaines), l'obésité et les troubles métaboliques associés au vieillissement agissent de façon synergique pour modifier la structure et la fonction vasculaire *in vivo* et *in vitro*.

On sait que le vieillissement artériel est caractérisé par des modifications au niveau de la paroi artérielle souvent associées à un état inflammatoire persistant qui conduit à une augmentation de la rigidité artérielle.

Dans le cadre de certaines pathologies, le fait de diminuer l'inflammation et de modifier le régime alimentaire permet également de réduire le niveau de rigidité artérielle, de pression artérielle, toutefois ceci n'a pas encore été établi au cours du vieillissement artériel. L'objectif principal de ce travail est d'analyser le rôle de l'inflammation systémique et locale aortique (notamment au niveau de l'aorte ascendante), et de l'hypertension dans la pathogenèse de la rigidité artérielle au cours du vieillissement, dans un modèle animal développant un syndrome métabolique.



Pour mener à bien ce projet, il est nécessaire d'utiliser des animaux car notre étude porte sur le syndrome métabolique et le vieillissement. Pour cela il faut que notre modèle les développe. Le meilleur modèle pour étudier le syndrome métabolique est le modèle animal où celui-ci est induit par un régime riche en graisses (remplacement).

Pour cela, un modèle murin développant un syndrome métabolique suite à un régime riche en graisses a été choisi. Ainsi, 80 souris mâles C57BL6J seront utilisées. Les souris seront divisées en deux groupes : un groupe de 40 souris qui recevront un régime riche en graisse et un groupe de 40 souris qui recevront un régime contrôle, pour une durée de 12 mois. Au cours de ce travail, les animaux seront leur propre témoin. En effet, les souris utilisées après 6 mois de régime seront également utilisées à 12 mois de régime (réduction).

Différentes expérimentations vont être effectuées le long du régime. Des mesures de pression artérielle systolique et de fréquence cardiaque seront réalisées et la détermination des paramètres métaboliques sera effectuée. Le Visualsonics®, un appareil d'échocardiographie sera utilisé afin d'étudier la fonction et la morphologie cardiaque. Des expérimentations de tomographie par émission de positons seront faites en parallèle pour étudier le métabolisme. Enfin la technique d'imagerie par résonance magnétique sera employée, afin de localiser la graisse brune interscapulaire et de déterminer le rapport eau/graisse pour chaque animal.

Pour les expérimentations de mesure de pression artérielle et de fréquence cardiaque, les animaux seront entraînés durant 3 jours avant les mesures (raffinement).

Après les 12 mois de régime riche en graisse ou contrôle, l'ensemble des souris seront mises à mort.

Afin de réduire la douleur des animaux, l'anesthésie par inhalation d'isoflurane sera effectuée et des antalgiques ou analgésiques seront utilisés afin de traiter la douleur de l'animal.

Les perspectives sont d'établir des cibles d'intervention permettant de réduire la rigidité artérielle. En effet, la connaissance plus précise, au cours du vieillissement, des mécanismes régulant les protéines de la matrice extracellulaire, leur organisation structurale et leur dégradation permettra d'envisager des actions pharmacologiques et ceci sur des zones de la paroi aortique ciblées.

6754. La néosporose due au parasite *Neospora caninum* est une maladie répartie dans le monde entier. Cette parasitose peut conduire à des avortements chez les ovins et les bovins avec des pertes économiques annuelles estimées à plus d'un milliard d'euros. Il n'y a actuellement pas de traitement ou de vaccin contre cette maladie. L'infection naturelle se fait par ingestion du parasite par voie orale (voie muqueuse).

L'étude repose sur l'administration par voie nasale ou intradermique (voies muqueuses) de nanoparticules comme vecteur de la vaccination contre une infection à *Neospora caninum* afin d'induire une réponse immunitaire protectrice (muqueuse et générale) dans un contexte de néosporose congénitale. Les nanoparticules, constituées de sucres et de lipides, sont biodégradables et non toxiques.

Les souris seront immunisées avec les nanoparticules chargées avec des protéines de *Neospora caninum* associées ou non à différents adjuvants potentiels naturels.

Seules les souris gestantes seront infectées et l'efficacité des différentes formules vaccinales sera déterminée par la protection de la descendance (diminution de l'infection).

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 276 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Les différentes formules vaccinales ont été testées *in vitro* sur des cellules du système immunitaire mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant de valider notre candidat vaccin.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques en tenant compte du rendement de gestation et de l'efficacité attendue.

- Raffinement : Les souris sont hébergées dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger, des maisonnettes sont en supplément pour les femelles gestantes).

6755. Le but de ce projet est de compléter la formation de radiologues interventionnels à la pratique du shunt intrahépatique transjugulaire (TIPS Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunt) : la communication entre deux veines à l'intérieur du foie. Cette communication est maintenue perméable par l'insertion d'un stent dédié. Cette technique est indiquée pour traiter l'hypertension portale compliquant les cirrhoses du foie ou d'autres maladies en lien avec les troubles de la coagulation. La difficulté technique de la procédure est liée à la nécessité de ponctionner à travers le tissu du foie. Dans de nombreux centres, une zone anatomique est prédéfinie et les ponctions sont ensuite réalisées plusieurs fois avant réussite. Dans notre centre, nous travaillons sous guidage échographique ce qui permet d'éviter de léser les organes proches du foie, les artères du foie, la vésicule biliaire...

Notre objectif est d'enseigner cette approche sous échographie, de familiariser les radiologues à l'utilisation du stent spécial et aussi de former les internes à la pratique de la biopsie du foie sous repérage échographique.

Nous utiliserons 45 porcelets sur 5 ans, à raison de 3 animaux par session de formation, pour un ensemble de 3 sessions annuelles.

Remplacement : une formation à un geste aussi technique ne peut s'envisager que sur modèle vivant pour en avoir les contraintes anatomiques et vasculaires.

Réduction : le nombre d'animaux a été réfléchi afin qu'il soit minimal par séance. Nous profiterons des sessions pour dispenser des formations à d'autres gestes techniques comme la biopsie échoguidée afin d'optimiser la mise à disposition du modèle.

Raffinement : les animaux seront sous anesthésie générale et sous traitement analgésique adéquat. Ils seront anesthésiés dès leur arrivée sur site afin d'éviter tout stress.

6756. Les maladies parodontales sont des pathologies inflammatoires à composante infectieuse conduisant à la destruction du système d'attache de la dent. Ces pathologies ont une prévalence de 60% dans les sociétés occidentales. En France, selon l'enquête ICSII réalisée par l'Association Dentaire Française sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 80 % des adultes entre 35 et 44 ans souffrent de maladies parodontales.

Beaucoup estiment à tort cette situation inéluctable et se résignent à porter vers 60 ans des prothèses complètes ou des implants dentaires. Des études récentes mettent en évidence les rapports entre maladie parodontale et état général, comme par exemple, la carence en vitamine D qui est associée à une perte d'attache parodontale. Cette carence est caractérisée par une minéralisation défectueuse du tissu ostéoïde de la matrice osseuse, pouvant conduire à du rachitisme et de l'ostéomalacie. Le rachitisme hypophosphatémique héréditaire est une maladie génétique caractérisée par un déficit rénal de la réabsorption du phosphate, un déficit du métabolisme de la vitamine D, et des défauts de minéralisation des os et des dents.

Le modèle murin du rachitisme hypophosphatémique lié au chromosome X de la souris Hyp constitue un intéressant modèle de rachitisme héréditaire chez l'homme.

Notre objectif est donc d'étudier la susceptibilité à la parodontite chez des souris communes et chez des souris hypophosphatémiques Hyp dans un modèle de parodontite expérimentale.

Pour cela, nous allons induire une parodontite expérimentale chez l'animal anesthésié.

Nous réalisons un suivi longitudinal de la perte osseuse induite par l'utilisation d'un microscanner.

Le nombre d'animaux nécessaire a été réduit au minimum, 30 souris seront utilisées.

Des expérimentations similaires ont montré que les souris ne souffraient pas au cours de ce modèle (prise de poids et comportement normaux). Cependant, en cas d'observation de douleurs durant la période de surveillance, nous administrons un antalgique et en cas d'observation d'infection aiguë, nous administrons un antibiotique. A notre connaissance, il n'existe pas de méthodes alternatives (*in vitro*, *in silico*) pour l'étude d'association entre maladies systémiques et maladies parodontales.

6757. Les cancers du foie et les métastases dans le foie de cancers de colon peuvent, dans certaines circonstances (taille, état de la maladie...), être traités par radiothérapie avec des schémas d'administrations similaires (doses prescrites, nombre de séances, durée de la séance). Il est essentiel de démontrer si l'origine de la tumeur localisée dans le foie peut influencer la sensibilité à différents schémas d'administration de la radiothérapie. Ainsi, les radiothérapeutes pourraient adapter leur prescription de radiothérapie afin d'améliorer la prise en charge de leurs patients.

L'objectif primaire de cette étude et d'évaluer l'effet de quatre différents schéma de radiothérapie sur la croissance de tumeurs PDX (c'est-à-dire qui sont issus de fragments de tumeurs de patients) de cancers du foie ou de cancers du côlon ayant développé des métastases dans le foie.

Afin de tenir compte de la variabilité biologique/génétique de chaque type de tumeur, le projet sera réalisé à partir de 5 modèles PDX de colon et 5 modèles PDX de cancer du foie. Les tumeurs seront greffées sur le dos de souris présentant un système immunitaire altéré afin de permettre le développement des tumeurs sans phénomène de rejet.

Pour chaque modèle, une étude de la croissance des tumeurs sera réalisée par une société de prestation de service. Cette étude permettra d'évaluer l'efficacité de quatre différents types de traitements par radiothérapie qui sera délivrée en une ou trois séances de durée plus ou moins longue.

En parallèle notre équipe réalisera étude des mécanismes de réparation de cassure de l'ADN puisque casser l'ADN est l'objectif à atteindre pour que la radiothérapie soit efficace.

La partie concernant l'étude de la croissance tumorale nécessite pour chacun des 10 modèles PDX analysés, l'utilisation de 58 souris. Pour atteindre cet effectif avec des tumeurs de taille comparable, la société de service doit greffer des fragments de tumeurs à 82 souris. Pour notre projet, nous utiliserons les 24 souris restantes de chaque modèle soit un total de 240 souris.

Afin de réduire la quantité totale d'animaux nécessaire au projet, pour chaque modèle, nous utiliserons les 24 souris « résidus » pour étudier les mécanismes de réparation des cassures de l'ADN qui seront induites par les 4 différents traitements de radiothérapie. Il ne sera donc pas nécessaire d'utiliser des animaux supplémentaires pour notre étude.

Dans une démarche de raffinement, les animaux seront traités par radiothérapie en une ou trois séances, sous anesthésie gazeuse, durant 1 à 5 minutes puis seront hébergés par cages de 4 ou 5 individus à l'animalerie de notre établissement.

Afin de remplacer au maximum l'utilisation d'animaux, les protocoles de biologie moléculaire, nécessaires à l'étude des mécanismes de réparation de l'ADN, seront optimisés à partir de matériel biologique issus de culture cellulaire (*in vitro*).

6758. La rétinopathie diabétique (RD) est une maladie présentant une angiogenèse anormale de la rétine liée à l'hyperglycémie observée chez les patients diabétiques. Au niveau mondial, plus de 112 millions de personnes souffrent de rétinopathie diabétique C'est la 1ère cause de cécité et de malvoyance dans la population active (avant 60 ans).

Cette pathologie rétinienne ischémique est également potentiellement pourvoyeuse de phénomènes de néovascularisation rétinienne associés à une fuite du réseau vasculaire rétinien responsable de l'œdème maculaire. L'ischémie rétinienne, par la dégénérescence cellulaire qui peut en résulter, est responsable de l'altération de la fonction visuelle.

Notre objectif est de mettre en place un modèle animal reproduisant de manières satisfaisantes les anomalies vasculaires rétiniennes observées chez l'homme.

Cette étude pourra nous permettre de mettre en évidence le possible rôle de taurine dans la RD. Ceci pourrait conduire à terme à développer de nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre les dégénérescences rétiniennes.

Il a été rapporté dans la littérature que l'inactivation du gène codant pour le transporteur de la taurine provoque une dégénérescence rétinienne due à la perte des photorécepteurs. Cependant, aucune étude n'a été entreprise pour étudier le possible rôle de ce récepteur protéique dans la RD.

Nous envisageons d'étudier le système vasculaire rétinien après inactivation du gène du transporteur à la taurine (souris KO Tau-T) chez les souris +/- et +/+. En parallèle, nous allons rendre diabétique ces souris dans le but de reproduire de manière satisfaisante les anomalies vasculaires rétinienne observées chez les patients atteints de RD et d'étudier l'impact conjointe d'une hyperglycémie et d'une déplétion permanente de taurine sur la rétine.

Le nombre total d'animaux nécessaire à cette étude sur 5 ans sera de 144 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain :

- 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ;
- 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ;
- 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées.

6759. Le lupus systémique érythémateux (LES) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique et une production pathogénique d'auto-anticorps et de complexes immuns aboutissant à la dégradation de certains organes (reins, rate). Notre projet innovant a pour but d'étudier l'efficacité anti-inflammatoire de 3 molécules contre cette pathologie *in vivo*. L'amélioration des signes cliniques dans une souche murine développant de manière spontanée un lupus (MRL/MpJ Fas lpr), permettra à court terme de valider l'effet thérapeutique des molécules de manière préclinique et de déterminer la toxicologie de nos agents thérapeutiques ; pour à plus long terme, valider leur utilisation chez des patients lupiques. Les expérimentations animales ne peuvent pas être remplacées par des expérimentations *in vitro*. L'efficacité anti-inflammatoire des molécules nécessite une première validation chez des souris lupiques avant de pouvoir être vérifiée chez l'homme. Dans le but d'obtenir des statistiques fiables, le nombre de souris sera réduit à 180, d'une part pour observer les signes cliniques du lupus au cours du temps et d'autres parts pour déterminer à quel moment les molécules doivent être administrées et pendant combien de temps pour observer une réduction voire une inhibition des symptômes. L'environnement des souris comportera divers enrichissements (roue, coton...) et des méthodes pour supprimer la souffrance seront utilisées quand cela sera nécessaire.

6760. Le projet vise à étudier les bases cérébrales de la communication vocale. Dans le monde animal, seules très peu d'espèces sont capables d'apprentissage vocal. Parmi celles-ci, les oiseaux chanteurs constituent un modèle privilégié pour essayer de comprendre comment le cerveau traite l'information contenue dans des signaux tels que le chant, comportement qui montre de nombreux parallèles avec le langage humain. Dans cette expérience, vingt étourneaux femelles seront utilisés pour étudier comment les réponses cérébrales au chant des mâles varient en fonction des saisons.

Remplacement : Les étourneaux sont des animaux extrêmement sociaux qui possèdent un comportement de chant très sophistiqué et étonnamment plastique. Ils constituent un modèle unique et irremplaçable pour nous aider à mieux comprendre le cerveau et sa plasticité, en lien avec la communication vocale et la vie sociale. De plus, ce sont des oiseaux solides et robustes, qui supportent bien la captivité.

Réduction : Dix femelles seront étudiées à l'automne et dix autres au printemps suivant. Dix est le nombre minimal que des scientifiques peuvent utiliser pour obtenir des résultats statistiquement significatifs et pouvoir tirer des conclusions. Il est à mettre en regard des milliers d'étourneaux qui se réunissent chaque soir dans certaines villes pour y passer la nuit.

Raffinement : Les réponses cérébrales seront enregistrées à l'aide des techniques les plus pointues et toutes les précautions seront prises afin qu'aucune souffrance inutile ne soit infligée aux animaux (utilisation d'anesthésiques, d'analgésiques et d'anti-inflammatoires). A la fin des enregistrements, les animaux seront gardés en vie et participeront à d'autres expériences n'impliquant aucune autre manipulation invasive ou contraignante (ils ne pourront faire l'objet que de tests comportementaux ou d'observations).

6761. La digestion est la résultante d'une compétition entre un phénomène d'hydrolyse et absorption et le phénomène de transit du chyme le long du tube digestif. Pour comprendre la digestion, il est donc nécessaire de comprendre cette compétition. En conséquence, le présent projet vise à mettre au point la méthodologie chirurgicale de double canulation duodénale et iléale chez le porc en croissance afin d'avoir accès aux digestats dans les différents compartiments du tube digestif et de décrire les phénomènes qui s'y déroulent dans la digestion. Cette technique nous permettra d'estimer la digestibilité des constituants alimentaires (hydrolyse & absorption) et d'étudier le transit digestif.

Afin d'évaluer la viabilité de cette méthodologie, 10 porcs adultes subiront une intervention chirurgicale sous anesthésie générale et l'utilisation raisonnée d'analgésiques pour réduire les souffrances de l'animal à leur minimum pour les équiper d'une canule duodénale et d'une autre iléale. Les animaux seront logés en cages individuelles permettant de contrôler leur consommation et de prélever les effluents à différents moments tout au long du processus digestif.

Ce protocole respecte la règle des 3R appliquées à l'expérimentation animale parce que la pose de canules digestives permet de limiter en grande partie le nombre des animaux, alors que sans celles-ci il faudrait euthanasier un animal pour chaque point de mesure (réduire et raffiner). De plus, cette double canulation accepte un schéma expérimental en « carré latin » où différentes matrices alimentaires peuvent être testées sur chaque animal (réduire et raffiner). Pour réduire le stress des animaux, les cages seront contiguës, ce qui permettra aux animaux de se voir et de se sentir afin d'éviter l'isolement social. Les animaux seront surveillés

régulièrement, afin de permettre une intervention immédiate en cas de souffrance, maladie ou tout autre problème (raffiner). La validation de ce protocole nous permettrait d'obtenir des modèles mathématiques quantitatifs afin de décrire cinétiques de digestion dans les différents segments du tube digestif, ce qui fera respecter la règle de remplacement dans les expérimentations animales futures (remplacement).

6762. Nous avons identifié que les plaquettes sanguines sécrètent de l'histamine et que cette histamine est capable de stimuler la croissance tumorale *in vitro*. Le projet consiste à caractériser le potentiel thérapeutique anti-métastatique d'inhibiteurs de l'histamine chez la souris que ce soit sur la régulation de la croissance de la tumeur mammaire primaire ainsi que sur le déroulement des étapes précoces de la dissémination métastatique des cellules tumorales de cancer du sein. Les règles d'expérimentation seront comme suit. (Remplacer) L'emploi des modèles animaux est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire *in vitro* la complexité physiologique des échanges entre les nombreux types cellulaires responsables de la dissémination métastatique. (Raffinement) Les souris seront tout d'abord placées en stabulation durant une semaine avant le début du protocole au sein de l'animalerie d'accueil. Elles cohabiteront par groupe de cinq dans un environnement enrichi (maison rouge, coton) sous surveillance quotidienne. Tout élément rentrant en contact avec la souris sera stérile : nourriture et litière sont irradiées, grilles, cages et biberons seront autoclavés. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. Le change de la litière et de la cage s'effectuera une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. L'observation de signe de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal. Lors de l'injection des cellules tumorales les souris seront anesthésiées. Elles seront traitées par la buprénorphine ou tout autre soin local, réhydratation nécessaires dans le cas d'apparition de signes de douleur ou de mal être. Les souris seront mises à mort à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant une exploitation maximale par des analyses histologiques des données issues de l'expérimentation chez l'animal. (Réduction) Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum (12 souris, protocoles court et long) indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Un nombre total de 120 souris sera donc nécessaire.

6763 Le diabète est une maladie chronique qui se caractérise par un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage des sucres apportés par l'alimentation. Elle peut être causée :

- par une insuffisance de sécrétion de l'insuline : diabète de type 1 dit insulino-dépendant.
- par une action perturbée de l'insuline suite à un développement d'un mécanisme de résistance qui rendent l'organisme insensible à l'insuline : diabète de type 2 dit non insulino-dépendant.

L'objectif de ce projet est de choisir les protocoles les plus adaptés de mise en place du diabète de type 1 et 2 chez le rat. Ces modèles devront être stables et cliniquement pertinents reflétant la situation physiologique et clinique de l'homme en vue de futures recherches.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative qui permette de tester des traitements pour limiter les effets délétères de l'hyperglycémie présents chez les diabétiques. Cette étude nécessite de travailler sur un modèle animal et le rat a été choisi, car d'après la littérature, c'est un très bon modèle pour étudier le diabète et il est l'une des espèces, avec la souris, sur laquelle le diabète est le plus étudié actuellement. De plus, le rat est une espèce pour laquelle les constantes biologiques et de bien-être animal sont largement connues et décrites.

Cette étude de mise au point de modèle de rat diabétique va nécessiter 80 animaux pour le choix du protocole. En effet, des groupes de 10 animaux seront utilisés, sur des protocoles ou les méthodes d'induction du diabète varieront. Une fois le mode d'induction validée, des études pourront être réalisées afin de tester l'efficacité de traitement pour limiter les effets néfastes de l'hyperglycémie sur l'organisme (angiopathie, rétinopathie, néphropathie, neuropathie). De plus, des modèles de pathologies liées au diabète pourront être testées (plaies cutanées du diabétique ou pied diabétique). Pour ces études, une estimation de 1830 rats sur 5 ans est prévue.

Ces études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des rats. Pour éviter le stress, les rats seront maintenus en groupes sociaux, et des moyens de nidification ou de rognage seront fournis. Des mesures seront prises pour prévenir systématiquement une dégradation de l'état général des animaux lors du développement de l'état diabétique.

6764 La myxomatose est une maladie majeure du lapin européen due au virus myxomateux, un membre de la famille des Poxviridae. C'est une maladie encore très présente en France et à l'étranger, tant sur le lapin de garenne que sur les lapins d'élevage. Les pertes causées par cette maladie sont généralement très lourdes. Deux formes de la maladie ont été décrites chez le lapin européen. La forme nodulaire, ou cutanée, est la forme la plus anciennement connue, encore représentée dans les élevages de type fermier, elle tend à disparaître dans les élevages industriels au profit de la forme amyxomateuse (forme "respiratoire").

Il n'existe aucun traitement contre la myxomatose. Le but de ce projet est de tester les propriétés antivirales de la molécule Sephin 1, récemment identifiée comme un inhibiteur spécifique de GADD34, une protéine de l'hôte. Des expériences récentes réalisées au laboratoire montrent que la Sephin 1 inhibe la répllication du virus de la myxomatose en culture cellulaire et nous souhaitons donc maintenant évaluer son pouvoir antiviral *in vivo*.

Nous allons évaluer le pouvoir antiviral de la Sephin 1 contre le virus de la myxomatose chez 15 lapins au total.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, les mesures suivantes sont appliquées :

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;
- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;

- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des lapins) sans restriction ;
- Manipulation des lapins dans des boxes isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai ;
- Mise en place d'une procédure d'évaluation des points limites spécifiques de la myxomatose permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.

6765. La période périnatale est critique pour les animaux en élevage. Au jeune stade les animaux sont plus sensibles aux variations externes. De plus des études récentes montrent que des stress périnataux peuvent être responsables de perturbations physiologiques et comportementales au stade juvénile et adulte. Une meilleure connaissance des effets de stress périnataux sur l'état de bien-être et santé de l'animal à court et long terme devrait permettre de mettre en place de nouveaux indicateurs de l'état de santé des animaux et éventuellement d'améliorer certaines pratiques d'élevage.

Nous proposons d'exposer les alevins à une eau de qualité dégradée (modifications des teneurs en O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> et ammoniac pendant 1 mois) et de mesurer les conséquences à court (à la fin du stress) et long terme (6 mois après le stress).

Les paramètres mesurés en relation avec l'état de santé et de bien-être seront :

- le comportement ;
- l'activité de l'axe corticotrope
- la régulation de l'homéostasie hydrominérale et gazeuse de l'animal
- l'analyse des défenses antioxydantes et stress oxydant
- l'analyse du système immunitaire

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 556 poissons. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses physiologiques et comportementales des poissons au stress.
- Réduire : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre une évaluation statistique de la variabilité individuelle (ou du groupe pour l'étude du comportement) de la réponse.
- Raffiner : Les prélèvements ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Le protocole permettra de décider d'une interruption de l'expérimentation en cas de franchissement du point-limite.

6766. Les muscles sont des tissus essentiels au sein de l'organisme. Ils représentent plus de 40 % de la masse corporelle et permettent le maintien de la posture, le déplacement et la respiration. Ils constituent également une réserve protéique importante.

Le muscle est un organe qui est capable de s'adapter et de répondre aux sollicitations, notamment pendant la croissance et avec l'entraînement. Avec l'âge ou l'immobilisation, la masse et la force musculaire décline, et de nombreuses pathologies conduisent à une atrophie musculaire, comme par exemple l'anorexie, le cancer et certaines maladies infectieuses (SIDA, Tuberculose) ou auto-immunes (Lupus érythémateux disséminé, hépatite auto-immune).

Des pathologies caractérisées par une atrophie musculaire telles que la dénutrition, la septicémie et la cachexie sont associées à une augmentation du taux circulant de glucocorticoïdes (GC).

De plus, bien que les GC constituent le principal traitement de maladies chroniques telles que l'eczéma et l'asthme, leur utilisation prolongée est problématique car ils induisent des effets secondaires importants tels que l'atrophie musculaire et peut même conduire à des myopathies.

La fonte de la masse musculaire peut conduire à une diminution de la qualité de vie, à des chutes et des fractures osseuses, et de ce fait, à un coût socio-économique important. L'identification de molécules permettant de maintenir la masse musculaire est donc un enjeu majeur des industries pharmaceutiques. Cependant, celle-ci reste difficile, car les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la masse et de la force musculaire sont encore mal caractérisées.

Notre objectif principal dans ce projet est définir les mécanismes par lesquels les GC régulent la masse et les fonctions musculaires chez des souris de type sauvage et des souris mutantes chez lesquelles le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est invalidé dans différents types cellulaires des muscles.

Afin de clarifier le rôle des GC dans la physiologie musculaire, des expériences permettant de déterminer la force, l'endurance, le métabolisme, et la régulation de la masse musculaire par différentes hormones seront réalisées.

- Remplacement : Etant donné que la masse et les fonctions musculaires sont contrôlées par divers facteurs, tels que la charge mécanique, la stimulation nerveuse, le stress, l'état nutritionnel et certaines hormones, notamment les GC, il est indispensable de travailler sur l'organisme entier.

- réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux, des souris ayant subi des expériences non invasives telles que la mesure de force par exemple, seront réutilisées pour effectuer des tests sur l'implication de certaines hormones dans la régulation de la masse musculaire.

Ces études seront répétées au maximum 8 fois sur 6 différentes lignées de souris, étant donné que nous souhaitons réaliser des études cinétiques. Sachant que pour effectuer des analyses statistiques solides, chaque étude sera réalisée sur un maximum de 8 souris par condition expérimentale. Cependant si l'étude révèle des conclusions statistiques avant que l'expérience soit terminée, cette étude sera arrêtée et les souris pourront servir à une autre étude dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Vu notre capacité d'élevage et d'analyse, nous étudierons en moyenne 20 souris par semaine toutes lignées confondues, c'est à dire environ 1000 souris.

- Raffinement : Si une des expériences peut avoir des conséquences sur la vie de l'animal, des mesures seront prises (utilisation d'analgésique, complémenté l'eau de boisson en sel, suivie du réveil et des points de chirurgie après anesthésie...) pour améliorer la vie de l'animal.

6767. Le but de ce projet est de tester *in vivo* la durée d'action d'une nouvelle molécule à visée thérapeutique dans le cadre d'une maladie rare orpheline, la glycogénose de type 1 (GSD1). Cette maladie se caractérise par des hypoglycémies sévères lors de jeûnes courts entraînées par l'incapacité de l'organisme de produire du glucose (sucre) en dehors des repas. De plus, ces patients développent des pathologies associées à l'accumulation de glycogène (stock de sucre) et de graisses dans le foie et les reins (organes qui produisent du glucose).

Nous disposons d'un modèle de souris transgéniques dont le gène *G6pc* a été muté uniquement dans le foie. Ces souris sont un modèle unique pour cette étude puisqu'elles ne peuvent pas utiliser leur glycogène hépatique et développent une hépatomégalie (gros foie) et une hypoglycémie légère au cours d'une période de jeûne court (6h de jeûne). Cependant, elles sont capables de réguler leur glycémie au cours d'un jeûne plus long grâce à une induction de la production de glucose de novo par les reins et l'intestin, organes non touchés par la maladie. De plus, elles ne présentent pas de phénotype dommageable à l'état nourri. L'accumulation de glycogène dans le foie n'entraîne pas de souffrance ou mal-être chez les animaux jeunes qui seront étudiés (<6 mois).

Lors d'une étude pilote, l'injection de cette nouvelle molécule a permis aux souris atteintes de GSD1 de diminuer significativement les stocks de glycogène hépatique après un jeûne prolongé de 24h et de réguler leur glycémie de façon similaire à des souris non malades. Ces premiers résultats très encourageants ont permis de valider cette approche. Nous proposons maintenant d'étudier l'effet de différentes doses et leur efficacité après 2, 4 et 7 jours. Nous étudierons l'effet de l'injection par voie intraveineuse de la molécule (3 doses à tester) sur la régulation de la glycémie et l'utilisation des stocks de glycogène au cours d'une période de jeûne de 24h. Les souris traitées devraient être capables de produire du glucose au cours du jeûne court (6h de jeûne) grâce à la dégradation des stocks de glycogène hépatique, et ainsi réguler leur glycémie. Pour analyser leur effet thérapeutique, ces molécules doivent être injectées chez l'animal avant de proposer de nouvelles perspectives de traitement aux patients.

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

Remplacement :

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

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ce modèle animal et du métabolisme glucidique (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'une première étude ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 6 souris mâles seront analysés. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction. Ce projet nécessitera l'obtention de 78 souris transgéniques au total. Un groupe de 6 souris non transgéniques sera utilisé comme contrôles. Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. La connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les organes d'intérêt.

En conclusion, ces études réalisées *in vivo* pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la GSD1. Au total, cette étude nécessitera 84 souris. La durée de l'étude est limitée à 6 mois et dépend du délai d'obtention des 78 souris transgéniques.

6768. Effet de peptides bioactifs issus de protéines laitières sur le développement et la santé du rat lors d'une exposition fœtale et/ou postnatale.

Il est bien établi que la santé à l'âge adulte dépend de nombreux événements survenus dès la gestation. L'environnement et plus particulièrement la nutrition de la mère et celle du nouveau-né peuvent avoir des conséquences importantes sur le développement. La gestation représente une fenêtre critique de programmation potentielle par l'environnement. En effet, des travaux déjà réalisés au laboratoire montrent que, chez le rat, il est possible d'induire des modifications du développement des rats, en intervenant sur le régime alimentaire au cours de la gestation et de la lactation. En effet, un régime hyperprotéique, qu'il soit donné à la mère au cours de la gestation, en période d'allaitement ou au petit au moment du sevrage, induit entre autres, à 6 semaines, une augmentation du poids, de la prise alimentaire et de l'adiposité. Au cours de cette étude nous proposons d'utiliser le même protocole expérimental que celui utilisé dans l'étude précitée, pour démontrer les effets bénéfiques de peptides bioactifs au cours de la gestation et de la lactation sur le développement du nourrisson.

Nous avons choisi de tester des peptides bioactifs issus de protéines laitières parce qu'il a été démontré que le lait contribue pour une part importante à l'approvisionnement de notre organisme en acides aminés essentiels indispensables à l'édification des tissus. Il est admis que les protéines alimentaires peuvent, en plus de leur vocation nutritive, exercer des rôles physiologiques grâce à la présence de peptides bioactifs insérés dans leur séquence. Les protéines laitières sont une source particulièrement bien dotée de tels peptides et sont porteuses d'activités diverses : anti-hypertensive, anti-thrombotique, anti-oxydante, immuno-modulatrice, anti-stress, antimicrobienne, antivirale, anti-tumorale et facilitatrice du transport de calcium ou encore de certains oligo-éléments.

La consommation de lait pendant l'enfance est essentielle, les protéines et les minéraux qu'il apporte sont nécessaires pour la croissance. Il est reconnu que le lait de vache a une influence positive sur la croissance des enfants. Mais les composants du lait responsables de la stimulation de la croissance ne sont pas encore bien identifiés. Il pourrait s'agir de protéines, de peptides, de

minéraux (calcium, phosphore), de vitamines ou d'un mélange de ces nutriments. L'évaluation de la qualité des protéines grâce à des indices bien définis a montré que les protéines du lactosérum présentent une qualité légèrement supérieure à celle de la caséine. Selon certaines études les protéines du lactosérum ont le pouvoir d'augmenter la masse musculaire et ainsi d'exercer un effet bénéfique sur la composition corporelle des enfants. Les constituants du lactosérum du lait de vache présentent également un certain nombre de propriétés potentiellement bénéfiques, comme la capacité de stimuler le système immunitaire, ce qui, dans certains cas, peut favoriser la croissance.

Ce projet a pour but d'évaluer l'impact de peptides bioactifs issus du lait au cours de la gestation et de la lactation sur le développement du raton juvénile. Les paramètres étudiés seront : la croissance, la prise alimentaire, la composition corporelle, la maturation de l'intestin, la densité minérale osseuse et le développement cérébral.

Afin d'étudier l'ensemble de ces paramètres, plusieurs expérimentations sont nécessaires et seront réparties sur 5 années. Les peptides qui seront testés *in vivo* auront été sélectionnés en fonction de leur efficacité *in vitro*.

Dans un premier temps, des études courtes dites de criblage seront réalisées afin de vérifier l'efficacité *in vivo* des peptides qui auront été sélectionnés *in vitro* (3 à 5 peptides seront testés). Le peptide sélectionné sera incorporé à l'alimentation de la mère (10g/kg de nourriture) afin d'évaluer ses effets sur le développement de ratons de 17 jours.

Dans un deuxième temps, nous évaluerons l'effet des peptides à plus long terme sur des femelles âgées de 10 semaines (début de l'âge adulte). Nous évaluerons l'efficacité du peptide lorsqu'il est incorporé au régime alimentaire à différents stades de développement des animaux : i) au cours de la gestation et de l'allaitement, ii) à partir du sevrage iii) de la gestation à l'âge de 10 semaines. Au cours de cette étude à long terme nous testerons 3 des peptides pour lesquels nous aurons démontré une efficacité sur le développement du raton au cours de l'étude de criblage.

Le stress potentiel représenté par l'hébergement en cage individuelle de la progéniture sera atténué par un enrichissement avec des tunnels en carton et une bille. Les cages possèdent des parois transparentes de façon à ce que les animaux puissent voir leurs congénères. Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Ce projet sera réalisé sur une période de 5 années, et nécessitera au total 550 animaux. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum exigé pour l'analyse statistique des paramètres mesurés et nous avons veillé à nous limiter aux seules expériences indispensables.

6769. Le traitement des pertes de substance mandibulaires segmentaires demeure un problème de santé publique. En France, la principale cause des pertes de substances segmentaire de la mandibule est la chirurgie d'exérèse carcinologique. 500 000 nouveaux cas de cancers des Voies Aéro-Digestives Supérieures sont diagnostiqués chaque année dans le monde. En France, ces cancers représentent 15 000 nouveaux cas par an chez l'homme et 2 000 nouveaux cas par an chez la femme. Si une résection interruptrice de la mandibule est nécessaire, une reconstruction mandibulaire est envisagée pour faciliter la mastication, maintenir la statique des muscles du plancher buccal et de la langue, faciliter la déglutition et conserver l'esthétique. La reconstruction repose le plus souvent sur le lambeau libre de fibula, mais ce lambeau présente l'inconvénient du temps opératoire et d'un nombre d'échecs non négligeable. Plus récemment, le traitement des pertes de substances osseuses segmentaires mandibulaires par la technique de la membrane induite a été étudié. Il s'agit d'une technique en 2 temps combinant l'induction d'une membrane induite *in situ* et une autogreffe osseuse spongieuse. Mais les études précédentes ont montré que la membrane induite présentait des limites liées à son absence de pouvoir ostéoinducteur (absence de cellules ostéoprogénitrices et faible quantité de facteurs de croissance) et à la nécessité d'un deuxième temps opératoire.

La membrane amniotique humaine (MAH) pourrait être une alternative à la membrane induite en cancérologie. La MAH est peu immunogène et son utilisation chez l'animal a déjà été approuvée, donc son implantation chez l'animal ne risque pas le rejet de la greffe. En plus, la MAH a des propriétés anti-tumorales.

La membrane amniotique cryopréservée a été utilisée chez l'homme en parodontologie associée à des substituts osseux pour traiter des atteintes au niveau des racines. La membrane amniotique pourrait remplacer avantageusement la membrane induite car elle ne nécessite pas de deuxième temps opératoire et elle contient des facteurs de croissance et des cellules souches qui pourraient favoriser la cicatrisation osseuse. Des expériences préliminaires effectuées dans notre laboratoire ont montré une réaction inflammatoire que nous souhaitons caractériser. Dans un premier temps, la MAH sera implantée sur un défaut osseux effectué sur des souris immunodéficientes (n = 48 souris Nude) et la réparation osseuse sera mesurée après un temps long (8 semaines). Dans un second temps, des souris immunocompétentes seront implantées (n = 72 souris C57Bl6) et la réaction inflammatoire sera analysée à des temps courts (1, 2 et 4 semaines). Ces expériences, qui ne peuvent être effectuées que *in vivo* pour observer à la fois la réparation osseuse et réaction inflammatoire, sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 120, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs. Une analgésie adaptée sera appliquée ainsi que des conditions de stabulation appropriées, permettant ainsi de réduire douleur, souffrance et angoisse.

6770. Dans un contexte de crise agricole, la sélection génétique des bovins est reconnue comme étant un levier majeur de compétitivité et de durabilité des élevages notamment face aux demandes sociétales sur le « produire mieux » (diminution de l'impact environnemental, respect du bien-être animal, produits de qualité...). Afin de répondre au plus vite à ces enjeux, il est nécessaire de réduire l'intervalle de génération dans le cadre des schémas de sélection de manière à apporter le plus rapidement possible le progrès génétique dans les élevages. L'utilisation des techniques de transfert embryonnaire (production d'embryons à partir d'une femelle donneuse d'intérêt et transfert dans des femelles receveuses de moindre valeur génétique) et l'utilisation d'animaux jeunes sont deux facteurs clés pour la réduction de cet intervalle chez une espèce pour laquelle le temps de génération est un facteur limitant. La production d'embryons n'étant efficace que chez les animaux sexuellement matures, les professionnels s'intéressent de plus en plus aux mécanismes gouvernant la puberté. L'apparition de celle-ci étant fortement liée au développement corporel des animaux, des

études antérieures ont montré qu'il était possible d'avancer significativement l'âge à la première ovulation des génisses en jouant sur leur nutrition pendant des étapes clés de leur croissance prépubertaire. Toutefois, les limites biologiques sont encore inconnues de même que la capacité de ces génisses précoces à produire des embryons de bonne qualité pour les besoins des schémas de sélection. Le projet présenté a pour objectif de mesurer les écarts de performances entre deux lots d'animaux de 16 génisses Holstein sevrées (soient 32 génisses au total) affichant des conduites alimentaires contrastées (850 g/jour correspondant à l'objectif théorique pour un vêlage à 24 mois versus une croissance plus soutenue autour des 1200 g/jour) depuis leur naissance jusqu'à leur puberté. Dès l'apparition de la puberté, les génisses entreront alors dans un processus de 3 collectes d'embryons *in vivo* (toutes les 7 semaines). Les performances mesurées comprennent un suivi de croissance et du métabolisme (pesées, prises de sang), de l'activité ovarienne (échographies, prises de sang) ainsi que de performances en termes de production d'embryons. Une attention particulière sera apportée au suivi (lactation, reproduction, santé) de la carrière « post-expérimentation » de ces femelles ainsi qu'à celle des animaux issus du transfert des embryons produits au cours de l'expérimentation. Cette expérimentation se place dans le respect des principes éthiques des 3 R. Remplacement : aucun modèle *ex vivo* n'étant à ce jour disponible concernant l'étude de la relation croissance des animaux, âge à la puberté et performances de reproduction, le recours à l'animal est nécessaire. Réduction : le protocole expérimental permet de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés pour garantir une approche statistiquement valable tout en conservant un minimum de variabilité individuelle. Raffinement : les génisses utilisées dans ce projet seront placées sous surveillance quotidienne (activité, comportement) et hébergées dans une stabulation répondant aux normes de bien-être animal chez cette espèce (présence d'igloos pour abriter les plus jeunes, accès aisé à l'auge et aux points d'abreuvements, présence de tapis caoutchouc derrière pour le confort des aplombs, accès à des brosses latérales et dorsales...).

6771. L'expansion inquiétante de l'obésité, souvent associée à un diabète de type 2, est notamment due à une alimentation hypercalorique riche en graisses. La qualité du régime d'une personne obèse peut être améliorée, en réduisant notamment les apports de graisses et sucres rapides, et en augmentant les apports nutritionnels de molécules comme les fibres alimentaires ou les protéines. L'effet bénéfique de protéines est connu par leur effet « coupe faim » alors que les fibres solubles dites prébiotiques améliorent notamment la sensibilité à l'insuline et réduisent les taux à jeun de cholestérol sanguin chez des sujets sains, ainsi que chez des sujets obèses et diabétiques. Tout le long de l'intestin et en particulier au niveau du côlon, le métabolisme intestinal de l'hôte ou des bactéries intestinales va fournir des produits de dégradation des protéines ou des fibres qui pourraient être utilisés comme substrats de la production de glucose par l'intestin. La production de glucose par l'intestin est détectée par le système nerveux central comme un signal métabolique bénéfique résultant en augmentation de la dépense énergétique, de la sensibilité à l'insuline et de la satiété. L'objectif de cette étude est de définir si des produits du métabolisme intestinal ou des bactéries intestinales sont impliqués dans l'induction des effets bénéfiques d'une alimentation enrichie en protéines sur le contrôle de la prise alimentaire et la sensibilité à l'insuline. Il s'agira entre autres de quantifier précisément la production de glucose par l'intestin suite à des régimes enrichis en intermédiaires du métabolisme des protéines. Cette étude implique une réponse intégrée du métabolisme énergétique, ce qui nécessite une étude chez l'animal. Leur métabolisme glucidique et énergétique sera mesuré *in vivo*, comme chez l'homme, par des tests de tolérance au glucose et à l'insuline.

L'ensemble des procédures sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Soixante-douze rats seront utilisés sur une période d'environ 2 ans. Ce nombre a été estimé après une étude de puissance statistique. Les rats seront élevés et hébergés par groupe de 2 rats/cage en milieu enrichi (lanières en papier kraft pour nidation, bois à ronger) et contrôlé. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane avec injection préopératoire d'analgésique et application d'analgésique local sur la peau. Toutes les procédures avec chirurgie seront sans réveil. Le suivi du comportement des animaux lors des différentes procédures se fera quotidiennement et toute modification de comportement ou signe de souffrance entraînera l'arrêt de la procédure.

Cette étude pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles bases scientifiques pour proposer à long terme de nouvelles thérapies anti-obésité ou anti-diabète.

6772. Les muscles squelettiques ont pour fonction d'assurer la motricité du corps dans son environnement, en permettant de faire bouger le squelette de manière volontaire. Ils sont composés de fibres multinuclées formées au cours du développement par la fusion de nombreuses cellules appelées myoblastes. Chez l'adulte, après avoir été lésées (en cas de maladie, après une blessure), les fibres musculaires peuvent régénérer à partir de cellules souches musculaires : les cellules satellites, qui vont être activées, donner de nouveaux myoblastes qui vont alors fusionner avec les fibres lésées ou bien former de nouvelles fibres musculaires multinuclées. Ce projet vise à mieux comprendre l'étape de fusion lors de la formation des fibres musculaires et aussi l'implication de certaines protéines présentes à la surface des cellules musculaires lors de la régénération du muscle. Une bonne compréhension des mécanismes de la fusion des cellules musculaires et de la régénération musculaire est primordiale notamment afin d'envisager d'améliorer les thérapies en cas de myopathies ou de lésions musculaires importantes liées à un accident ou à l'âge par exemple. Pour mener à bien ce projet, afin de limiter le nombre de souris utilisées, nous réalisons une grande partie de nos expériences *in vitro*, en utilisant des cellules musculaires. Cependant les approches *in vitro* ne permettent pas d'étudier tous les aspects physiologiques de la fusion des cellules musculaires comme la relation avec le microenvironnement. L'expérimentation sur des souris est donc indispensable dans la mesure où, par définition, la régénération musculaire ne peut être étudiée qu'*in vivo*. Aucune méthode de remplacement permettant d'éviter le recours à l'expérimentation animale n'est disponible pour cet aspect du projet. Nous étudions plusieurs molécules de la même famille et nous disposons de souris génétiquement modifiées qui n'expriment plus ces molécules ce qui nous permet d'étudier l'importance de leur expression au cours de la formation des muscles et la régénération. Nous disposons d'une animalerie dans laquelle les souris sont surveillées quotidiennement. Les procédures que nous utilisons pour



induire la régénération n'entraînent pas la mort des animaux mais seulement une atteinte des muscles étudiés et sont réalisées afin de limiter au maximum la souffrance des animaux. Pour ce projet nous estimons à 760 le nombre de souris que nous utiliserons.

6773. L'amélioration du statut sanitaire de l'animalerie « rongeurs » permettrait d'avoir de meilleurs résultats zootechniques au sein de nos élevages, de respecter le bien-être des animaux et d'obtenir une meilleure fiabilité des résultats scientifiques en évitant les biais expérimentaux liés à un mauvais état sanitaire. De plus l'obtention d'un statut sanitaire EOPS faciliterait les échanges de lignées avec d'autres établissements d'expérimentation animale.

Depuis de nombreuses années, notre unité héberge et maintient des rats et des souris présentant divers statuts sanitaires allant du conventionnel à l'EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique). L'animalerie héberge divers pathogènes de la souris dans la zone conventionnelle, ce qui représente potentiellement un risque de contamination de la zone EOPS. Afin d'améliorer le statut sanitaire nous prévoyons de nettoyer l'ensemble des lignées de souris soit par transfert d'embryons (chirurgie et transfert d'œufs fécondés à des femelles pseudo-gestantes saines), soit par hystérectomie aseptique (ablation des cornes utérines, réanimation des petits et adoption sous femelles nourrices propre), puis de les héberger en zone EOPS.

Les animaux utilisés seront issus du surplus en élevage, et non produits en plus pour les procédures, afin d'optimiser l'utilisation de ces derniers. Les animaux auront leur milieu enrichi type maison et/ou papier ouate. Aussi les animaux qui présenteront le moindre mal être avant, pendant et après les procédures, seront euthanasiés car ils ne pourront pas être utilisés et présenteront un risque de contamination dans nos élevages.

Après le transfert d'embryons, si une femelle présente des difficultés à la mise-bas, elle sera également euthanasiée ainsi que les petits afin d'éviter toute souffrance durant une mise bas difficile qui finit généralement par la mort de la mère et de ses petits.

Les futures lignées importées à l'IERP seront introduites en zone EOPS en utilisant les mêmes techniques. Le nombre d'animaux utilisé par lignée nettoyée n'excédera pas 20 animaux. Et le nombre de lignées nettoyées par an sera variable en fonction des projets soit en moyenne 10 lignées par an pour un total qui ne dépassera pas les 1000 animaux pour l'ensemble du projet.

6774. Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De tels traitements ont fait l'objet d'essais cliniques dans différentes pathologies de l'inflammation comme les molécules inhibitrices du TNF-alpha (une des principales cytokines sécrétées par le système immunitaire innée et responsable de l'inflammation). Seulement, l'effet de ces molécules n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés sera de 1300 souris (réparties dans 4 modèles différents, selon 4 axes par modèles, et 5 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfourer et se cacher.

6775. Les métastases osseuses sont les complications les plus fréquentes du cancer du sein, engendrant douleurs et fractures chez les patientes. Nous étudions la dissémination des métastases des cancers du sein dans les os et ceci afin d'améliorer les thérapeutiques préexistantes mais aussi pour entrevoir de nouvelles thérapies ciblées. Nous étudions l'activité d'une molécule, l'intégrine  $\alpha 5$ , qui est très présente dans les cellules cancéreuses et qui stimule la formation des métastases dans les os. Nous avons montré qu'un anticorps qui bloque l'activité de cette intégrine réduit la présence de métastases dans les os.

Nous voulons donc étudier la dissémination des cellules humaines de cancer du sein dans la moelle osseuse de souris après injection intra-artérielle de cellules tumorales dans lesquelles l'intégrine  $\alpha 5$  n'est pas du tout présente ou qui au contraire en contiennent de

grandes quantités. Nous utilisons un modèle murin de métastases osseuses et pourrons ainsi comprendre comment l'intégrine  $\alpha 5$  favorise la formation des métastases chez ces souris. Si l'absence de l'intégrine  $\alpha 5$  dans les cellules cancéreuses diminue la formation des métastases, nous proposerons l'intégrine  $\alpha 5$  comme cible thérapeutique potentielle dans le traitement des métastases osseuses chez l'homme.

Les protocoles seront conduits selon les règles d'expérimentation en vigueur au sein de l'animalerie d'accueil, conformes aux exigences de remplacement, réduction et raffinement. Ainsi, au sein de l'animalerie d'accueil, les souris seront sous surveillance quotidienne avec nourriture et eau de boisson fournies à volonté et tout élément rentrant en contact avec la souris étant stérile. Le change de la litière et de la cage s'effectue une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Pendant toute la durée de l'étude, l'état de bien-être des animaux est évalué quotidiennement. L'observation de signe de douleur ou de mal être entraînera la sortie du protocole de l'animal. Les souris seront anesthésiées par voie chimique lors de l'injection des cellules tumorales, par l'isoflurane lors de l'implantation sous-cutanée de la pastille d'œstrogène. Elles seront traitées par la Buprénorphine lors de l'apparition des lésions osseuses. Les expériences réalisées précédemment avec ce modèle murin de métastases osseuses justifient d'utiliser ce même modèle animal de formation de métastases osseuses dans le cadre du présent projet. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Cette étude nécessite 40 souris pour l'étude durant 8 jours et 40 souris pour l'étude durant 21 jours et donc un nombre total de 80 souris.

6776. La maladie de Lesch-Nyhan (LND) est une maladie génétique rare induite par la mutation sur le chromosome X du gène codant l'enzyme HPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransférase). Cette maladie neurologique touche environ une naissance sur 300 000, préférentiellement des garçons. Le déficit en HPRT entraîne dès la naissance une synthèse excessive d'acide urique responsable du développement d'une néphropathie sévère. Se développe aussi un large spectre de manifestations neurologiques dont des mouvements anormaux de type dystonique, empêchant la station debout, et un syndrome compulsif d'automutilation. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement, avec un décès du malade avant l'âge de 30 ans.

La quantification post-mortem du taux de différents neurotransmetteurs montrent une réduction sévère du taux de plusieurs métabolites de la voie de synthèse de la dopamine dans les cerveaux d'individus LND. Un rôle causal de la déplétion néo-natale en dopamine dans certains troubles neurologiques, mouvements anormaux et l'automutilation, a été confirmé dans un modèle de rat dans lequel la destruction sélective des neurones produisant la dopamine a été induite par l'injection de 6-OHDA chez des nouveau-nés, modèle dit phénotypique de la maladie de Lesch-Nyhan. Aussi, la restauration de niveaux physiologiques de dopamine dans le cerveau des enfants atteint de la maladie de Lesch-Nyhan apparaît être une approche thérapeutique pour corriger l'ensemble des symptômes neurologiques.

Le principe de ce projet est de repositionner en pédiatrie une approche de thérapie génique qui a montré son efficacité chez des personnes atteintes de la maladie de Parkinson, maladie de l'adulte dont l'étiologie est proche de celle de la maladie de Lesch-Nyhan. Dans les deux cas, les symptômes neurologiques sont dus à une diminution du taux de dopamine dans les noyaux profonds du cerveau. Cette approche a consisté à injecter dans le striatum des patients une version modifiée du virus de l'anémie équine (EIAV), pour introduire dans les neurones de cette région les gènes permettant la néo-production de dopamine. Ces neurones ont pu consécutivement produire de la dopamine. En rétablissant ainsi les niveaux de dopamine dans le striatum des malades atteints de Parkinson, leurs symptômes moteurs se sont clairement améliorés. Notre but est donc d'évaluer l'efficacité de cette approche pour les enfants atteints de Lesch-Nyhan.

Nous avons déjà démontré l'efficacité d'OXB-102 à induire la production de dopamine dans des neurones humains déficients en HPRT *in vitro*. Notre objectif est donc à présent de tester sa capacité à corriger les symptômes neurologiques dans le modèle phénotypique de la maladie, c'est-à-dire dans le rat 6-OHDA juvénile.

Une première étude pilote a permis l'implémentation de ce modèle au sein du centre d'expérimentation. Dans l'étude citée, l'efficacité et l'innocuité du vecteur seront évaluées dans ce modèle.

Elle se déroulera en 2 phases chez le rat :

• Phase 1

Le but est d'évaluer la tolérance des 2 injections à quelques semaines d'intervalle ainsi que la biodistribution cérébrale du vecteur.

-La 1ère injection sera effectuée par voie intracisternale à l'aide d'une neurotoxine (6-OHDA) chez le rat (n=10) à 2-3 jours d'âge afin de reproduire les symptômes de la maladie de Lesch-Nyhan

-A 5-6 semaines d'âge un vecteur test, le LacZ EIAV (ou GFP EIAV), sera injecté au niveau du striatum par stéréotaxie.

-A 7-8 semaines d'âge, les animaux seront euthanasiés pour histologie et évaluation de la biodistribution du vecteur.

• Phase 2

-30 animaux seront lésés à 2-3 jours de vie après administration de la neurotoxine par voie intracisternale sous anesthésie. 5 autres recevront une solution saline par la même voie d'administration.

-A S5, une première administration par voie orale de L-Dopa 100 mg et Carbidopa 25 mg (Modopar®) permettra d'identifier les animaux ayant développé le phénotype « Lesch-Nyhan » Les animaux seront divisés en 3 groupes : à S6 injection stéréotaxique intrastriatale du vecteur thérapeutique OXB102 (n=10), du même vecteur dépourvu des gènes thérapeutiques, (contrôles, n=10) et d'une solution saline (n=4)

-Entre S8 et S12, les animaux recevront 3 injections de Modopar® et les événements moteurs L-Dopa induits seront suivis.

-En fin d'étude, les animaux seront sacrifiés afin d'étudier la distribution du vecteur, l'expression des gènes thérapeutiques et la production de dopamine.

Selon notre expérience lors de l'étude pilote, au total 44 rats seront donc nécessaires afin d'obtenir en finalité le nombre voulus d'animaux par groupe : n=10 (groupe 0) ; n=4 (groupe 1) ; n=10 (groupe 2) ; n=10 (groupe 3)

L'application de la règle des 3R sera effectuée comme suit :

- Réduction

La constitution des groupes d'animaux est basée sur notre expérience précédente lors de l'étude pilote pour laquelle nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles avec des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Cela permettra une analyse statistique des résultats afin de conclure ou non à l'efficacité du vecteur étudié en comparaison aux contrôles.

- Raffinement

Le bien-être animal passera notamment par :

- de bonnes conditions d'hébergement selon la réglementation en vigueur avec un enrichissement du milieu
- un suivi régulier des animaux (observations biquotidiennes, pesées régulières, analyse du comportement)
- l'instauration de points limites pertinents et précoces et la mise en place de mesures adaptées si nécessaire (anesthésies, traitements analgésiques ou euthanasie si pas d'autre alternative)
- Afin d'améliorer la réactivité du personnel animalier, une grille de scoring de la douleur est mise en place dès que celle-ci s'avère nécessaire afin de pouvoir détecter précocement tout point limite et mettre en place les actions adéquates.
- la mise en place de mesures adaptées en fonction des interventions (anesthésie, analgésie si nécessaire : anti-inflammatoire non stéroïdien dilué dans l'eau de boisson.).

6777. Les rétrovirus endogènes humains (HERV) sont naturellement présents dans le génome humain mais généralement maintenus sous silence. Il est toutefois récemment apparu qu'une forte proportion de patients atteints de schizophrénie et de troubles bipolaires présente des taux anormalement élevés d'une protéine d'enveloppe du virus HERV-W, la protéine Env, qui pourrait affecter la distribution d'un type de récepteurs du glutamate, neurotransmetteur excitatrice majeur, à la surface des neurones et ainsi causer l'apparition de troubles psychotiques. Pour tenter de confirmer cette hypothèse échauffée à partir de données *in vitro*, nous allons caractériser *in vivo* comment la surexpression de la protéine Env pourrait perturber le fonctionnement cérébral. Pour cela, nous allons électroporer les neurones de la région de l'hippocampe de jeunes rats avec de l'ADN pour sur-exprimer la protéine Env dans cette région spécifique du cerveau impliquée dans la formation de la mémoire et détériorée chez les schizophrènes. L'électroporation aura lieu entre le 1er et le 2ème jour post-natal, une période du développement cérébral où l'efficacité de l'incorporation d'ADN est maximale. Plusieurs tests comportementaux indolores seront ensuite menés entre le 35ème et le 65ème jour post-natal, période au cours de laquelle devraient apparaître les premiers symptômes pathologiques, pour détecter des altérations progressives des capacités cérébrales symptomatiques de la schizophrénie :

- Test d'interaction sociale, pratiqué au 35ème jour post-natal
- Test de nouveauté spatiale, pratiqué au 44ème jour post-natal
- Test d'inhibition du réflexe de sursaut, pratiqué entre le 45ème et le 65ème jour post-natal

Le cerveau de ces animaux sera ensuite prélevé après leur euthanasie pour mener des analyses biochimiques et immunohistochimiques de l'expression des récepteurs du glutamate.

A titre de contrôle, les mêmes expériences seront reproduites sur un groupe d'animaux ayant reçu une électroporation d'ADN codant pour la protéine fluorescente verte, la GFP, non impliquée dans les troubles schizophréniques et sur un groupe d'animaux non opérés. Les tests comportementaux mis en œuvre pour détecter les perturbations induites par la surexpression de la protéine Env nécessitent de constituer des groupes de 16 animaux, pour avoir un échantillonnage statistique suffisant. Au total, 6 lots de 16 animaux et 1 lot de 10 animaux seront nécessaires à la réalisation du projet, soit un total de 106 animaux, nombre minimum mais nécessaire pour le respect du R de réduire de la règle des 3R. Les approches comportementales de ce projet pour mesurer des déficits sensoriels nécessitent d'utiliser des animaux. Il n'y a pas d'autres méthodes alternatives que d'utiliser l'animal entier. De même, pour respecter le R de raffinement de la règle des 3R, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux et des points limites suffisamment prédictifs seront définis pour limiter la souffrance tout au long de la vie de l'animal.

6778. Au cours des dernières décennies, les inquiétudes vis-à-vis des changements survenus dans l'environnement et de leurs conséquences possibles sur la fonction de reproduction humaine et animale se sont amplifiées. Un faisceau d'évidences plaide pour une origine fœtale de troubles de la reproduction observés à l'âge adulte. Ces désordres résulteraient d'une exposition pendant la vie fœtale à des substances chimiques, qu'elles soient d'origine environnementales (polluants environnementaux comme les phtalates ou les pesticides) ou iatrogènes (médicaments, comme par exemple le Distilbène®). Beaucoup de femmes rapportent à l'échelle mondiale la consommation d'analgésiques et surtout de paracétamol à différents stades de la grossesse. Or, c'est précisément pendant la vie fœtale que se constitue la réserve d'ovocytes (gamètes) disponible pour la vie reproductive de la femelle adulte. Afin d'appréhender l'impact d'une exposition au paracétamol sur les phases critiques du développement des ovaires, une étude *in vivo* à l'échelle de l'organisme entier est indispensable (Remplacement). Comme modèle animal, nous nous proposons d'utiliser le rat, dont la métabolisation du paracétamol est comparable à celle de l'Homme. Par ailleurs, les étapes de différenciation des cellules fœtales ovariennes chez le rat présentent l'avantage d'être individualisées dans le temps, permettant ainsi de déterminer précisément s'il existe des fenêtres de sensibilité au paracétamol.

Un total de 42 femelles gestantes sera divisé en 4 lots : 1- Contrôle (6 rattes – SANS paracétamol) ; comparé à deux lots de 18 rattes chacun avec 2- Paracétamol [50mg/kg/jour] correspondant à la prise maximale recommandée chez l'homme ; 3- Paracétamol [150mg/kg/jour] correspondant à 3 fois cette dose ; ou 4- Paracétamol [300mg/kg/jour] correspondant à une dose témoin présentant un effet sur l'ovaire. Dans cette étude, seules des doses non toxiques de paracétamol seront utilisées. Toutefois si les animaux

présentaient des signes de souffrance, les points limites seront appliqués. Par ailleurs, afin de ne pas stresser les femelles gestantes, le traitement sera administré par le biais d'un biscuit vanillé contenant le paracétamol ou son solvant (Raffinement). Chacune des doses sera ingérée quotidiennement sur deux périodes distinctes de la différenciation des cellules ovariennes – « mitose » versus « méiose » – ou encore sur une période couvrant ces 2 phénomènes. Dans le but de minimiser le nombre de rats requis, le lot contrôle recevant le biscuit sans paracétamol sera traité sur l'ensemble des 2 phases (Réduction). Les effets seront évalués sur la totalité des nouveau-nés, soit une estimation de 336 à 420 ratons à raison de 8 à 10 petits par portée, par l'analyse histologique des gonades, ainsi que par des dosages hormonaux. Par soucis de valorisation optimale des animaux utilisés, les testicules des nouveau-nés males seront collectés au même titre que les ovaires, et le sang sera également prélevé sur l'ensemble des portées afin d'évaluer dans un second temps l'impact du paracétamol sur le développement testiculaire.

6779. La maîtrise des gestes techniques expérimentaux réalisés sur les animaux de laboratoire est un gage de préservation du bien-être animal et de qualité scientifique. C'est également une obligation réglementaire pour toute personne amenée à mettre en œuvre des procédures expérimentales et réaliser l'euthanasie des animaux. Ce projet a pour objectif de couvrir les besoins en formation du personnel dans le cadre de la formation initiale ou du suivi des compétences. Ce projet permet de garantir la meilleure préparation du personnel à la mise en œuvre des procédures expérimentales ainsi que la manipulation des animaux selon les bonnes pratiques vétérinaires au sein de notre centre de recherche.

Les gestes réalisés (ex : administration, prélèvement, mise à mort, préparation à la chirurgie) seront d'un degré de gravité réel au maximum modéré. En fonction du geste technique considéré, les animaux pourront être anesthésiés dans le premier temps de la formation et une analgésie sera mise en place.

Dans les cas où cela est possible, les formations sont réalisées, par ordre de préférence :

- sans avoir recours à l'animal vivant : formations virtuelles de type e-learning, matériaux synthétiques, animaux morts ou euthanasiés dans le cadre d'autres projets
- avec recours à l'animal vivant lorsque cela est indispensable : animaux surnuméraires ou animaux issus d'une procédure expérimentale antérieure et répondant aux critères de réutilisation

Si aucun animal n'est disponible, des animaux seront commandés spécifiquement pour les besoins de formation.

Afin de réduire le nombre global d'animaux utilisés dans notre centre de recherche, les prélèvements effectués dans le cadre de la formation pourront être conservés en vue d'études sur cellules ou tissus isolés. Les animaux pourront également être réutilisés pour d'autres études après une période de récupération et avis favorable d'un vétérinaire en accord avec les principes de réutilisation indiqués dans la réglementation. Enfin certains animaux pourront être proposés à l'adoption ou placés dans un autre centre prévu à cet effet.

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le comité d'éthique, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux, et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Le nombre maximal d'animaux utilisés sur 5 ans sera au maximum de : 500 souris, 100 rats, 100 cobayes, 100 hamsters, 100 gerbilles, 25 lapins.

6780. La maîtrise des gestes techniques expérimentaux réalisés sur les animaux de laboratoire est un gage de préservation du bien-être animal et de qualité scientifique. C'est également une obligation réglementaire pour toute personne amenée à mettre en œuvre des procédures expérimentales et réaliser l'euthanasie des animaux. Ce projet a pour objectif de couvrir les besoins en formation du personnel dans le cadre de la formation initiale ou du suivi des compétences. Ce projet permet de garantir la meilleure préparation du personnel à la mise en œuvre des procédures expérimentales ainsi que la manipulation des animaux selon les bonnes pratiques vétérinaires au sein de notre centre de recherche.

Les gestes réalisés (ex : administration, prélèvement, mise à mort, préparation à la chirurgie) seront d'un degré de gravité réel au maximum modéré. En fonction du geste technique considéré, les animaux pourront être anesthésiés dans le premier temps de la formation et une analgésie sera mise en place.

Dans les cas où cela est possible, les formations sont réalisées, par ordre de préférence :

- sans avoir recours à l'animal vivant : formations virtuelles de type e-learning, matériaux synthétiques, animaux morts ou euthanasiés dans le cadre d'autres projets
- avec recours à l'animal vivant lorsque cela est indispensable : animaux surnuméraires ou animaux issus d'une procédure expérimentale antérieure et répondant aux critères de réutilisation

Si aucun animal n'est disponible, des animaux seront commandés spécifiquement pour les besoins de formation.

Afin de réduire le nombre global d'animaux utilisés dans notre Centre de Recherche, les prélèvements effectués dans le cadre de la formation pourront être conservés en vue d'études sur cellules ou tissus isolés. Les animaux pourront également être réutilisés pour d'autres études après une période de récupération et avis favorable d'un vétérinaire en accord avec les principes de réutilisation indiqués dans la réglementation. Enfin certains animaux pourront être proposés à l'adoption ou placés dans un autre centre prévu à cet effet.

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des consignes établies et validées par le comité d'éthique, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux, et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Le nombre maximal d'animaux utilisés sur 5 ans sera au maximum de : 250 souris, 500 rats, 100 cobayes, 100 hamsters, 100 lapins, 50 chiens, 50 porcs et 50 primates non humains.

[Autorisation abrogée]

6781. Les Staphylocoques représentent un enjeu majeur en santé publique. Ces bactéries sont responsables de près de 40% des infections acquises au cours de l'hospitalisation (infections dites nosocomiales) et d'une proportion équivalente d'infections acquises en dehors de l'hôpital (infections dites communautaires). *Staphylococcus aureus* est responsable d'un large spectre d'infection qui va du simple furoncle à des infections profondes mettant en jeu le pronostic vital du patient.

Pour permettre la mise en place de ces infections, *S. aureus* produit un grand nombre de facteurs de virulence dont l'expression doit être finement régulé au cours du temps par diverses protéines mais également par de petites molécules appelées ARN régulateurs. L'objectif de ce projet est d'étudier le rôle de ces ARN régulateurs sur la virulence de *S. aureus* au cours de l'infection.

Aujourd'hui, l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques et de souches de plus en plus virulence nous contraint à mettre en place de nouveaux moyens de lutte contre cette bactérie. La compréhension des mécanismes de régulation nous permettra de mettre en place de nouveaux moyens de lutte contre ces pathogènes émergents. Pour chaque procédure expérimentale, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats interprétables. L'utilisation d'animaux est essentielle pour la réalisation de ce projet et la souris reste un modèle adapté aux recherches envisagées. Actuellement, un enjeu majeur de la recherche fondamentale est la compréhension des mécanismes de régulation de *S. aureus* pour permettre la mise en place de nouveaux moyens de lutte contre les infections induites par cette bactérie. Ainsi, en nous appuyant aux résultats préalables obtenus *in vitro*, nous avons choisi de mettre en place 2 procédures expérimentales correspondant aux infections étudiées et de limiter ainsi le nombre d'animaux utilisées. L'utilisation d'un modèle animal est nécessaire pour cette étude puisque indispensable pour la compréhension du processus infectieux mettant en jeu les ARN régulateurs. 274 souris femelles C57Bl/6 seront utilisées pour cette étude.

6782. Les bases neurobiologiques de l'altération mnésique propre à l'état de stress post-traumatique restent aujourd'hui encore peu connues. Cet état est caractérisé par une altération qualitative de la mémoire impliquant simultanément une hypermnésie et une amnésie. Le passage d'une mémoire émotionnelle normale à une mémoire pathologique implique l'activation de nombreux gènes via notamment des modifications d'états d'acétylation/méthylation des histones. Ce projet a pour objectif d'étudier les modifications épigénétiques susceptibles de sous-tendre le passage d'une mémoire émotionnelle normale à une mémoire de type traumatique. Ainsi, en identifiant les bases neurobiologiques spécifiques de la mémoire traumatique, ce projet doit ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de ce trouble anxieux.

Cette étude sollicite un modèle comportemental développé récemment au sein de l'équipe qui permet de modéliser chez la souris l'altération qualitative de la mémoire observée chez des patients atteints de stress post-traumatique. Ce projet nécessite l'utilisation de 960 souris issues d'un centre d'élevage agréé. L'utilisation de ces animaux se justifie pour plusieurs raisons :

- 1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'étudier les processus mnésiques. L'organisation du système nerveux central de cette espèce est assez proche de celle de l'Homme, ce qui permet une extrapolation acceptable des résultats obtenus chez ces espèces à l'espèce humaine.
- 2) Le modèle comportemental a été établi chez la souris et les appareils comportementaux sont dimensionnés pour cette espèce. La réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la nouvelle directive européenne, par la prise en charge de toute douleur ou souffrance et la mise en œuvre de points limites appropriés.

6783. Les cancers de la lèvre, de la cavité orale et du pharynx représentent un problème de santé publique puisqu'ils se situent en France au 5ème rang des cancers incidents chez l'homme avec 7600 nouveaux cas et 3270 décès en 2011. Les principaux facteurs de risque sont le tabac et l'alcool. Le cancer de la cavité orale peut se développer à partir de lésions dites potentiellement malignes, pouvant se transformer en cancer, et dont la plus fréquente est la leucoplasie orale. Cependant, l'histoire naturelle de ces lésions est difficile à prévoir et les aspects cliniques et histologiques ne sont pas suffisants pour prédire la transformation maligne de ces leucoplasies orales. C'est pourquoi les scientifiques étudient des modifications plus fines touchant les molécules d'ADN, d'ARN ou les protéines. L'objectif de ce travail est d'étudier la dynamique de ces changements moléculaires (génomique) au cours du temps dans un modèle murin, dans le but d'identifier les anomalies moléculaires clés qui conduisent au cancer. Le modèle murin induit par le 4-NQO, agent carcinogène, est particulièrement adapté à l'étude de la dynamique de ces changements moléculaires car il reproduit la séquence tumorale observée dans les cancers de la cavité orale chez l'homme : muqueuse normale qui subit successivement des changements histologiques à type d'hyperplasie, de dysplasie puis de tumeur. L'intérêt de ce modèle, pour améliorer les stratégies de prévention chez les malades porteurs de leucoplasies orales, a été l'objet de précédentes publications

Nos objectifs sont : i- poursuivre la caractérisation moléculaire de la dynamique observée dans ce modèle ; ii- établir des lignées cellulaires dérivées de ce modèle, à chaque étape du processus tumoral, pour permettre de mieux comprendre l'efficacité de thérapies ciblées. Afin de mener à bien ce projet, et tenant compte des travaux déjà publiés sur ce modèle murin de carcinogénèse par le 4-NQO, notre protocole inclura 126 souris afin de disposer de suffisamment de matériel biologique pour rendre interprétables nos résultats.

Au cours de l'élaboration de ce projet, nous allons veiller au respect de la règle des 3R, visant à : 1-"réduire" le nombre d'animaux en expérimentation ; 2-"raffiner" la méthodologie utilisée pour diminuer le "mal être" ou la souffrance des souris, et enfin 3 : "remplacer" le modèle *in vivo* par des modèles "*in vitro*" ou *in silico* dès que possible. Afin de réduire le nombre de souris incluses dans l'expérimentation, nous avons calculé le nombre minimum de souris à inclure, en prenant en compte notre expérience ainsi que les publications utilisant ce modèle, en particulier par rapport au pourcentage de lésions observées. De plus, le suivi rigoureux des

animaux, incluant notamment une pesée hebdomadaire, permettra de limiter la souffrance et l'arrêt de la procédure en cas de morbidité trop importante. Enfin, un de nos objectifs est d'établir des lignées cellulaires dérivées des différentes étapes du processus tumoral, à partir desquelles pourront être testées plusieurs drogues sans avoir à sacrifier de nouvelles souris, permettant ainsi de remplacer le modèle *in vivo* par un modèle *in vitro*.

Nombre maximal d'animaux utilisés : 126 souris.

6784. Les virus de la Septicémie Hémorragique Virale (vSHV) et de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) sont responsables de maladies piscicoles sévères dans les élevages de salmonidés. L'Union Européenne a mis en place un système de surveillance vétérinaire pour ces maladies basées sur une classification de zones ou piscicultures en fonction de leurs statuts sanitaires (présence/absence du virus), et des sommes importantes sont investies chaque année pour assurer son fonctionnement. Ces virus présentent une endémicité parmi la population de poissons marins sauvages. Les virus de type vSHV isolés de poissons marins sauvages ne produisent généralement pas ou peu de mortalité chez les truites arc-en-ciel d'élevages continentaux infectées par balnéation (mise en contact du virus et des poissons via l'eau des bassins d'élevage), et inversement. Des observations similaires ont été rapportées pour les virus de type vNHI. Cependant, à l'heure actuelle, aucune méthode conventionnelle de virologie ou sérologie ne permet de discerner les virus isolés de poissons marins des virus isolés de poissons d'eau douce. Le développement de nouveaux outils permettant la différenciation fine de ces souches virales virulentes ou non virulentes permettrait d'améliorer significativement la surveillance et la gestion des élevages piscicoles français, pour lesquels la truite arc en ciel est une espèce majeure, mais aussi européens.

Dans ce contexte, les objectifs de ce projet sont i) d'identifier des marqueurs génétiques de virulence pour le vSHV et le vNHI et ii) de développer une méthode rapide et fiable permettant de discriminer les isolats viraux en fonction de leur caractère pathogène, ce qui permettrait d'améliorer la gestion sanitaire des élevages.

Trois procédures expérimentales seront menées sur des truites arc en ciel juvéniles (moins de 6 mois) élevées au sein de la structure d'expérimentation. La première consistera à déterminer les profils de virulence d'une quarantaine d'isolats viraux en suivant la mortalité induite après contamination des animaux par balnéation. Cette étape est indispensable pour sélectionner certains isolats dont le génome sera totalement séquencé en utilisant des méthodes récentes à haut débit. La comparaison des séquences génétiques des souches fortement, moyennement ou faiblement virulentes permettra ensuite de mettre en évidence des zones du génome viral potentiellement impliquées dans la virulence. La seconde procédure visera à confirmer le rôle de ces zones dans la pathogénicité des virus en contaminant expérimentalement des poissons avec des souches recombinantes (souches dont le matériel génétique a été modifié) dans lesquelles ces zones auront été insérées, construites par des méthodes de génétique inverse. Les zones dont l'implication dans la virulence des souches virales sera confirmée pourront ensuite être ciblées spécifiquement par des outils de diagnostic moléculaire qui seront développés puis validés dans le cadre d'une troisième procédure expérimentale qui permettra également de fournir des matériaux de référence pour l'organisation d'un essai inter-laboratoire.

Le critère de mortalité utilisé pour déterminer le niveau de virulence et répondre aux objectifs fixés ne permet pas de remplacer les animaux mais les procédures expérimentales ont été élaborées afin de réduire au maximum leur nombre et de raffiner leur utilisation. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel, ...). L'infection par balnéation sera également privilégiée par rapport à l'injection. Le nombre d'alevins (<10g) nécessaires pour l'évaluation de la virulence des souches sera au maximum de 9850. La réalisation des infections expérimentales pour les phases d'estimation de la virulence, à raison de 3 répétitions pour une souche testée, répond aux exigences statistiques et intègre les problématiques de densité et de variabilité inter-bacs.

6785. Il existe des traitements pour les patients ayant un cancer du sein ou de la prostate avec les atteintes cancéreuses secondaires de l'os (métastases osseuses), qui ciblent spécifiquement les métastases. Cependant ces traitements ne sont pas autorisés pour la prévention chez les patients présentant un haut risque des métastases osseuses. Cela est particulièrement vrai pour les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif (avec des tumeurs que n'expriment pas les récepteurs pour l'œstrogène, la progestérone et le HER2, donc sans alternatives thérapeutiques). Ces patients sont actuellement soignés par chirurgie, chimiothérapie ou avec d'autres traitements non ciblés et toxiques. Par ailleurs, il est connu qu'au moment de la chirurgie les cellules cancéreuses ont en général déjà quitté le site de la tumeur primitive et ont peut-être établi des foyers indétectables de la maladie dans d'autres organes tels que la moelle osseuse et les poumons. L'un des principaux objectifs du développement des thérapies ciblées est de viser ces foyers résiduels de la maladie pour retarder ou éviter le développement des métastases.

Dans ce contexte, l'efficacité d'une thérapie par le denosumab qui cible l'os est mal connue à cause de l'absence d'un modèle murin approprié pour le tester. Nous avons au laboratoire à disposition ce modèle murin. Notre projet a pour but de mieux caractériser ce modèle et de tester l'efficacité du denosumab pour prévenir la dissémination précoce à l'os et aux autres organes des cellules cancéreuses du sein et de la prostate.

Scientifiquement ce projet permettra de comprendre d'avantage les premières étapes de la dissémination du cancer. D'un point de vue clinique, le projet va permettre de compléter les résultats d'un essai clinique en cours dans lequel le denosumab est testé chez des patientes atteintes d'un cancer précoce du sein à haut risque de métastases. Cette étude pourra bénéficier aux futures patientes atteintes de cancer précoce du sein.

Durant les 5 ans de l'étude, nous prévoyons d'utiliser environ 1240 souris Balb /c Nude, exprimant la cible humaine du médicament à tester.

Les animaux seront injectés avec des cellules cancéreuses en présence ou en absence de traitement. La croissance tumorale dans la moelle osseuse et dans d'autres sites potentiels peut entraîner des effets négatifs sur les animaux comme une perte de poids.

Cependant, comme nous nous intéressons aux événements de dissémination précoce, le niveau de gravité attendu sur les animaux devrait rester modéré. La croissance tumorale et les atteintes osseuses seront suivies par des méthodes d'imageries non invasives. Les animaux seront euthanasiés dès les premiers signes d'atteintes osseuses.

Remplacement - La dissémination et la croissance des cellules cancéreuses aux sites secondaires impliquent les cellules cancéreuses mais également les cellules normales des organes touchés. Par conséquent, l'étude de ces phénomènes *in vitro* en boîte de pétri reste trop artificielle pour mimer la complexité d'un organisme.

Réduction – La réalisation d'études pilotes permettra d'établir l'évolution de la croissance tumorale et permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaires à un minimum. En outre, l'utilisation de l'imagerie *in vivo* non invasive pour suivre l'évolution des tumeurs et les atteintes osseuses permettra de réduire le nombre d'animaux requis.

Raffinement - L'utilisation d'un modèle de souris Balb/c nude immunodéprimées exprimant la cible humaine du médicament à tester, auxquelles seront injectées les cellules cancéreuses humaines, permet d'être le plus proche possible d'une situation clinique et est incontournable pour les études précliniques et cliniques. Pour minimiser les dommages causés aux animaux, ils seront logés par groupe de 6 individus maximum par cage, dans un environnement enrichi pour réduire le risque d'infection avec une litière appropriée, du matériel de nidification, des nichoirs. La nourriture et l'eau de boisson seront fournies ad libitum. L'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement. Les animaux seront euthanasiés s'ils présentent des signes de douleur ou de mal être (prostration, état du pelage, perte de poids), prennent des infections ou tombent gravement malades.

6786. L'intense recherche fondamentale sur les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup> et les lymphocytes Th17 en particulier qui a été menée depuis une dizaine d'années permet aujourd'hui d'envisager des avancées thérapeutiques significatives dans de nombreuses maladies autoimmunitaires telles que le psoriasis, la sclérose en plaques ou différents types d'arthrites. Cependant, des résultats décevants et même des conséquences néfastes ont au contraire été reportés dans le contexte des maladies inflammatoires de l'intestin. L'engouement né de ces interventions doit donc être nuancé au regard de la complexité encore mal appréhendée de la biologie des cellules Th17 mais aussi d'autres cellules immunitaires innées ou adaptatives dépendantes du facteur de transcription ROR $\gamma$ t. Une hypothèse émergente depuis quelques années pour expliquer cette complexité implique le rôle du microbiote intestinal et son équilibre avec les pathogènes pour réguler les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>.

Dans ce projet, nous souhaitons déterminer le rôle de gènes de fonctions inconnues, Tmem176a et b, dans des modèles reconnus de colites inflammatoires chez la souris. Ce travail chez l'animal est incontournable avant d'envisager de nouvelles approches chez l'homme en relation avec le ciblage de la fonction de ces gènes.

Nous souhaitons réaliser des expériences chez la souris de laboratoire C57BL/6. Nous utiliserons en particulier des souris génétiquement modifiées que nous avons générées pour annuler l'expression des gènes homologues Tmem176a et Tmem176b (souris double KO : DKO) qui sont fortement exprimés dans les cellules ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>. Ces souris ne présentent pas de problèmes de développement, d'anomalies particulières ou de pathologies spontanées comparées à des souris sauvages. Nous posons l'hypothèse que ces gènes interviennent dans des processus d'immunité et/ou pathologiques dans le contexte de l'inflammation de l'intestin induite par une infection pour laquelle nos souris DKO pourraient être soit résistantes soit plus susceptibles.

Réduire : Les modèles que nous avons sélectionnés sont largement reconnus dans la littérature scientifique comme étant associés à une incidence de développement inflammatoire forte et synchronisée, ce qui permet l'utilisation d'un nombre restreint de souris par expérience afin d'obtenir une réponse rapide et pertinente. Le nombre maximum de souris que nous prévoyons d'utiliser est 40 par modèle (80 pour les deux modèles).

Raffiner : Nous veillons au bien-être de nos souris en élevage par une inspection régulière (3 à 5 fois par semaine) afin de détecter au plus tôt tout état de stress ou pathologique, surveiller les portées et effectuer les sevrages. L'enrichissement (ajouté sous la forme de tampons de coton) est désormais généralisé, à la fois pour les cages d'accouplement, les souris sevrées et séparées par sexe ou pour les cages d'expérimentation. Nous plaçons un minimum de 2 souris par cage (5 maximum) pour éviter le stress de l'isolement. Lorsque cela sera nécessaire, des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux. Lors de l'expérimentation, les souris seront inspectées quotidiennement jusqu'à deux fois par jour.

Remplace : L'utilisation de tels modèles animaux est pleinement justifiée par l'absence de systèmes *in vitro* alternatifs permettant d'analyser la complexité des actions des gènes Tmem176a et Tmem176b dans la muqueuse colique.

6787. L'objectif principal de l'Etude proposée vise à caractériser l'impact de deux compléments alimentaires sur les fonctions clefs du tube digestif, i.e. la fonction de barrière de la muqueuse intestinale et la motricité intestinale ainsi que sur le microbiote intestinal chez la souris. Les propriétés des deux composés seront évaluées en conditions normales puis inflammatoires. Tout en tenant compte du principe des 3R (limitation des effectifs (3-4 animaux par groupes); raffinement des conditions d'hébergement des souris en ajoutant des « frisstis » à la litière ainsi que des igloos dans les cages leur permettant de jouer, se cacher; remplacement quand possible), l'étude proposée se déroulera de la manière suivante : le complément alimentaire ou bien un placebo (témoin) seront administrés aux souris par voie orale pendant 4 semaines. Pour cette étude 80 animaux maximum seront utilisés. Les animaux seront divisés en 4 groupes : 1 groupe recevant le complément alimentaire A ; 1 groupe recevant le complément alimentaire B et 2 groupes contrôle. La semaine précédant le début du traitement et durant les 4 semaines de traitement, la motricité intestinale et la perméabilité intestinale seront évaluées *in vivo* à l'aide de différentes approches expérimentales (décrites ci-après). Après les 4 semaines de traitement, les groupes recevant le complément A, le complément B et un groupe contrôle seront soumis à un traitement au DSS induisant une colite afin d'évaluer l'impact des 2 compléments alimentaires sur l'inflammation digestive. Enfin, les souris seront sacrifiées et des prélèvements seront effectués. Des segments d'intestins ainsi que la rate seront prélevés afin d'étudier l'expression de différents gènes impliqués dans les processus inflammatoires.

6788. De nos jours encore, le pronostic des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives reste très péjoratif. La survie médiane des patients atteints de gliomes de haut grade varie de un à six ans. L'échec des traitements actuels s'explique d'une part par les difficultés à obtenir une exérèse chirurgicale complète de ces tumeurs hautement infiltrantes, et d'autre part du fait du faible taux de pénétration des drogues couramment utilisées non seulement dans la tumeur, mais également dans le tissu cérébral adjacent au sein duquel surviennent près de 80% des récidives. Le gliome infiltrant du tronc cérébral (DIPG) est une tumeur qui atteint le jeune enfant. A la différence d'autres gliomes de haut grade de l'enfant, celle-ci est caractérisée par sa localisation dans le tronc cérébral et son profil infiltrant et demeure à ce jour incurable. Nous avons récemment développé des modèles de ces tumeurs issues de cultures cellulaires dérivées de patients (CDX) chez la souris, pour permettre de mimer le développement de cette maladie.

La faible pénétration cérébrale est liée à l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui tapisse la microvascularisation cérébrale et se compose de cellules endothéliales intimement liées entre elles par des jonctions serrées. Cette barrière physiologique empêche environ 98% des petites molécules et 100% des grosses molécules d'atteindre le parenchyme cérébral. Différentes techniques ont déjà été développées afin d'augmenter la perméabilité de la BHE. Parmi elles, les ultrasons pulsés en association avec un agent de contraste ultrasonore ont déjà prouvé leur capacité à ouvrir la BHE de manière transitoire (entre 6 et 8 heures), sans dommage induit sur le tissu cérébral.

L'objectif de ce projet est d'améliorer la biodisponibilité du panobinostat et du dasatinib dans le cerveau en ouvrant la barrière hémato-encéphalique afin d'améliorer la fenêtre thérapeutique. Pour cela, nous allons réaliser une cinétique de pénétration des molécules d'intérêt dans nos modèles puis vérifier que l'activité anti-tumorale de nos médicaments est supérieure quand la BHE est ouverte sans entraîner de toxicité majeure. La méthode par ultrasons délocalisés qui sera employée pour ouvrir cette BHE est déjà décrite et publiée par l'équipe avec laquelle nous collaborons et nous ne détaillerons donc pas les mécanismes d'ouverture qui ne sont pas l'objet de ce travail. Néanmoins, nous adapterons dans un premier temps les réglages à nos modèles.

Pour réaliser cette étude, nous prévoyons d'utiliser au maximum 620 souris Swiss Nude. La cinétique des molécules de traitement sera évaluée chez l'animal sain puis et dans un modèle de DIPG à raison de 5 souris par point de cinétique. L'activité antitumorale sera évaluée chez l'animal malade à raison de 10 souris par groupe, et ces études seront répétées une seconde fois pour confirmation uniquement si le premier essai présente une efficacité significative de l'une des molécules évaluées. L'ensemble des procédures sera réalisé dans le respect de la règle des 3R et du bien-être de l'animal. L'utilisation de l'animal est indispensable pour évaluer une cinétique de diffusion de médicaments dans le cerveau et est obligatoire d'un point de vue réglementaire pour suggérer une nouvelle indication. Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum pour valider nos résultats statistiquement. L'évaluation de l'efficacité sera déterminée à l'aide de courbes de survie (Kaplan Meier) et de suivi longitudinal de la croissance tumorale par bioluminescence, avec application de points limites très précoces, réduisant au maximum la douleur et la souffrance animale. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie et une analgésie ou une euthanasie compassionnelle sera pratiquée dès l'apparition d'un point limite.

6789. L'objectif principal de notre équipe est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule.

Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps entiers, fragments, affinités, liposomes, etc...), de plusieurs ligands et de plusieurs radioéléments.

La mise en œuvre de nos protocoles nécessite donc un calendrier contraint de production de radioéléments et de préparation du radiopharmaceutique afin de réaliser nos expérimentations.

Nos études suivent le même protocole.

Cette étude est réalisée pour tester 15 nouveaux ligands produits par nos chimistes pour lier le vecteur à un radioélément de manière stable.

Le ligand radiomarqué est d'abord injecté à des souris sans tumeur et nous étudions sa biodistribution à différents temps, avec des groupes de 3 souris/ temps en choisissant 8 temps.

Puis, le système vecteur- ligand-radioélément est testé sur des cellules tumorales en culture.

Quand l'efficacité est démontrée, les cellules tumorales sont greffées à des souris.

Le système vecteur- ligand-radioélément est injecté aux animaux porteurs de tumeurs pour étudier la distribution dans un organisme vivant, la fixation du radioélément sur la tumeur et tous les organes.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme.

Règle des 3R :

Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests *in vitro* sur les cellules tumorales.

Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie.

Diminuer le nombre d'animaux nécessaires à nos études en développant dans un autre projet, l'imagerie pour les études de biodistribution pour lesquelles la même souris sera imagée à différents temps au lieu d'être sacrifiée.

Au total 5184 souris seront nécessaires pour ces études permettant de tester de nouveaux vecteurs, ligands et radioéléments.



6790. Les fractures osseuses se soignent en réalignant et en maintenant l'os concerné pendant le temps nécessaire à la cicatrisation. Cependant, ce processus naturel d'autoréparation appelé l'ostéogénèse peut ne pas suffire. Des problèmes mécaniques ou biologiques peuvent empêcher cette autoréparation. De plus, certaines pathologie (pseudo-arthrose) ou interventions chirurgicales (ablation de tumeur, de foyers infectieux) peuvent aboutir à des pertes de substance osseuse de plusieurs centimètres. Dans ce cas, la reconstruction osseuse doit être assistée. Les situations cliniques imposant une reconstruction osseuse, font appel à différentes techniques, toutes imparfaite (tel que la greffe d'os autologue exposant à une morbidité sur le site donneur et dont la quantité d'os disponible est limitée). Un dispositif médical a été développé combinant l'utilisation d'un ostéo-inducteur (favorisant la croissance de l'os), un ostéo-conducteur (favorisant l'orientation de la croissance de l'os) et de cellules souches. Ce dispositif est sous forme de film, qui peut recouvrir tout type de matériaux quelle que soit la géométrie et délivre les molécules de manière localisée et ainsi augmente l'efficacité, en limitant les effets indésirables.

L'objectif de ce projet est de vérifier l'efficacité de ce dispositif, chez un animal de taille comparable à celle de l'Homme, et en situation microbiologique moins favorable comme la cavité buccale

Ces études seront réalisées sur animaux vivants, car ce protocole d'efficacité et de stabilité d'un dispositif médical nécessite d'utiliser un animal vivant. Les modèles choisis sont le porc miniature et le chien Beagle. Ce sont des espèces de taille moyenne, dont la taille du crâne est similaire à celle de l'Homme, et dont la structure mandibulaire constitue un bon support expérimental. Aucune méthode substitutive n'est disponible à l'heure actuelle pour ce type d'étude. Ce projet utilisera un maximum de 20 porcs et de 20 chiens, nombre maximal d'animaux envisagé, sur plusieurs sessions étalées sur 5 ans. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des mini-porcs et des chiens, en limitant leur stress par un hébergement collectif, et en fournissant des jeux et un substrat adapté aux cochons et aux chiens. Les animaux seront manipulés, soignés et suivi quotidiennement par du personnel spécialement formé pour l'évaluation de l'état de santé et du bien-être des porcs et des chiens.

6791. Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des cancers agressifs, difficiles à traiter, et leurs causes sont peu connues. Cependant des travaux récents suggèrent un rôle important de p53, une molécule clé dans la mort cellulaire et donc cruciale dans l'élimination des cellules anormales ou précancéreuses.

Nos travaux dans un modèle de souris ne possédant pas le gène p53 (p53KO) ont permis de mettre en évidence un nouveau type de PTCL dont l'origine est un lymphocyte T non conventionnel, appelé NKT. Nous avons montré que ces lymphomes NKT (ou NKTL) présentent des caractéristiques de cellules activées chroniquement et partagent des points communs avec certains lymphomes humains. D'autre part, l'infection des souris p53KO avec une bactérie (*Streptococcus pneumoniae*) augmente l'apparition de ces lymphomes dans les souris. Nous pensons que le développement de ces lymphomes serait associé à la stimulation chronique des NKT par des molécules exprimées par certaines bactéries, comme *Streptococcus pneumoniae*, appelées antigènes glycolipidiques. Nous voudrions confirmer cela en simulant une infection chronique chez les souris p53KO par l'injection répétée d'un antigène modèle capable d'activer spécifiquement les NKT. Nous observerons alors l'impact qu'a cette stimulation chronique sur le développement de lymphomes.

Ces résultats, en association avec nos expériences précédentes, devraient nous permettre d'affiner notre hypothèse concernant le développement de lymphomes NKT induits par stimulation chronique. Plus globalement, cela renforcera le concept selon lequel certaines infections bactériennes chroniques sont capables d'induire des lymphomes.

Les mécanismes de développement des lymphomes étant complexes, ils ne sont pas reproductibles *in vitro*. Par conséquent il n'existe à l'heure actuelle aucunes méthodes alternatives pouvant se substituer à l'utilisation du modèle animal. La souffrance animale est limitée au maximum grâce à une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. 75 souris seront nécessaires pour ce projet.

6792. Le choc cardiogénique est lié à une défaillance du cœur (principalement suite à un infarctus) entraînant des désordres de la circulation sanguine et par conséquent des problèmes métaboliques et viscéraux. C'est une pathologie fréquente en réanimation et malgré les progrès de la prise en charge, sa mortalité reste élevée (50 %). La prise en charge hémodynamique des états de choc accompagnés d'un bas débit cardiaque (index cardiaque < 2.2 l/min/m<sup>2</sup>) reste problématique et non standardisée notamment dans le choix des vasopresseurs (substances qui augmentent la pression sanguine et qui contractent les artères).

Actuellement, il n'existe aucune étude s'intéressant au traitement vasopresseur du choc cardiogénique. La seule vraie recommandation est que la dopamine ne doit plus être utilisée. En France, une enquête de pratique réalisée par notre groupe montre que deux molécules sont utilisées (l'adrénaline et la noradrénaline) mais avec un fort effet prescripteur. Par conséquent, la question reste entière et nécessite une étude randomisée.

L'objectif de cette étude randomisée et prospective est de tester l'efficacité relative de l'adrénaline par rapport à la noradrénaline afin de standardiser le geste thérapeutique dans le traitement du choc cardiogénique ischémique.

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en terme d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique (remplacer).

Ce projet utilisera des porcs adultes (poids = 50-60kg, n=24). Ce modèle est déjà en place dans notre structure permettant de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, le nombre d'animaux serait de n=24 (comprenant une mortalité maximale de 30%) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable (réduire).

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique permet ainsi un raffinement de la méthodologie.

6793 La césarienne est un acte couramment réalisé chez les ruminants en pratique vétérinaire rurale. Il est donc important qu'un étudiant vétérinaire puisse apprendre et pratiquer cet acte chirurgical au cours de ses études avant de devoir le réaliser sur des animaux de propriétaires. De manière plus large, cet enseignement de 4<sup>ème</sup> année permettra la mise en pratique des gestes et attitudes de base de la chirurgie des grands animaux (tranquillisation, anesthésie - analgésie, nettoyage - désinfection, conditions d'asepsie, incisions, sutures...) dont la théorie est enseignée en 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> année du cursus (Art. R. 214-105 - alinéa 1 - f du code rural modifié par le décret 2013-118).

Le projet présenté s'inscrit également dans l'apprentissage de la gestion de la douleur animale, de son évaluation à son traitement. Il suit les recommandations de l'expertise scientifique collective (2009) "Douleurs animales" réalisée par l'INRA à la demande du ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche. Ainsi, les protocoles d'anesthésie et d'analgésie adaptés au statut des animaux et à l'intervention réalisée sont rigoureusement mis en œuvre.

Afin de limiter le nombre d'animaux, il est prévu de n'utiliser qu'1 brebis par groupe de 2 ou (plus souvent) 3 étudiants, soit environ 50 à 60 brebis par an, donc au plus, 300 brebis sur 5 ans.

6794. Devant l'utilisation croissante des nanomatériaux dans le secteur alimentaire, les conséquences d'une exposition orale aux nanoparticules (NPs) soulèvent des questions de santé publique. Le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) est déjà largement utilisé comme pigment alimentaire blanc (colorant E-171), mais ses propriétés bactéricides lui promettent aussi un usage répandu dans le secteur de l'emballage, pour la conception de films minces bio sourcés dotés de propriétés antimicrobiennes. D'autres NPs sont utilisées comme agents anti-mottants (silice amorphe SiO<sub>2</sub>) ou complément nutritif (oxyde de zinc, ZnO).

Toutefois, les NPs provoquent des effets toxiques sur la cellule et sont répertoriées (TiO<sub>2</sub>) comme potentiellement cancérogènes pour l'homme après exposition aérienne. L'objectif du présent projet est d'approfondir et de suivre chez le rat et la souris le devenir des NPs ingérées avec l'alimentation le long du tube digestif, leur absorption intestinale ainsi que leur impact sur l'intégrité de cette barrière biologique, y compris sur le système immunitaire et le système nerveux de l'intestin. La distribution et le passage transépithélial des NPs seront explorés *in vivo* et *in vitro*, en utilisant les propriétés d'autofluorescence des oxydes métalliques pour identifier les voies préférentielles d'absorption. Les conséquences fonctionnelles seront évaluées chez le rat (3250 animaux) et la souris (2100 animaux) en 5 ans en termes de perméabilité de l'intestin, d'inflammation et de réponses immunitaires. Ces observations permettront de produire pour les agences sanitaires (ANSES) une estimation du risque d'exposition orale aux nanomatériaux.

De plus, la règle des 3R a été prise en compte, en toxicologie les méthodes alternatives ne permettraient pas de répondre à toutes les questions posées d'où la nécessité de disposer d'un modèle physiologique intégré. Le bien-être animal est pris en compte par la mise en place d'un enrichissement des cages par ajout de sopalin, petite maisonnette, briques en bois, ainsi qu'un hébergement en groupe des animaux. Des points limites seront appliqués si nécessaire. Enfin, le nombre d'animaux par groupe a été réduit en fonction de la puissance statistique que l'on souhaitait. En effet le nombre d'animaux par groupe a été optimisé en fonction des analyses réalisées, l'histologie nécessitant moins d'animaux que l'évaluation de l'impact sur le système immunitaire.

6795. Des études cliniques menées dans les années 50, complétées par des travaux expérimentaux sur des modèles animaux, ont montré que l'hippocampe est une structure cérébrale qui joue un rôle central dans certaines formes de mémoire, en particulier la mémoire épisodique et la mémoire spatiale. La principale théorie de la mémoire postule que les informations initialement codées par l'hippocampe sont progressivement transférées vers le cortex pour assurer un stockage à long terme. Ce processus est appelé « consolidation mnésique », et semble se produire tout particulièrement pendant le sommeil. Plusieurs rythmes cérébraux pourraient être impliqués, en particulier les oscillations lentes et les fuseaux thalamo-corticaux, ainsi que les ondulations hippocampiques, mais leurs interactions sont encore mal comprises.

Nous avons récemment confirmé que les ondulations hippocampiques jouent un rôle primordial dans la consolidation mnésique, une hypothèse fondatrice proposée il y a vingt ans, qui avait inspiré de très nombreux travaux mais n'avait jamais été confirmée. Depuis, nous avons poursuivi nos investigations et nos travaux en cours confirment un rôle complémentaire du cortex.

Pour mieux comprendre les mécanismes de ce dialogue hippocampo-cortical, nous étudierons les interactions entre ces deux structures pendant le comportement et le sommeil, dans le but de comprendre comment se forme la mémoire à long terme. Pour ces expériences, nous utiliserons des rats Long-Evans mâles (40), qui constituent le modèle animal de référence pour l'étude de la mémoire spatiale. Nous évaluerons les performances des rats pendant des tâches de mémoire spatiale, et nous étudierons les modifications induites au niveau d'ensembles de neurones enregistrés simultanément dans plusieurs structures cérébrales. Cette double approche comportementale et neurophysiologique nous permettra de mieux comprendre les mécanismes de la consolidation mnésique.

Pour limiter autant que possible le nombre de rats requis pour ce travail, nous utiliserons des technologies d'enregistrements de pointe permettant d'échantillonner les réponses de dizaines de neurones simultanément, à la fois aux niveaux hippocampique et cortical, dans le but de maximiser l'information obtenue pour chaque rat. Les chirurgies se feront en conformité avec la réglementation (anesthésie et antalgie appropriées), et les légères restrictions alimentaires nécessaires à la motivation des animaux et pour éviter le surpoids feront l'objet d'un suivi méticuleux (surveillance quotidienne, alimentation à volonté dès que la diminution du poids dépasse 15%).

6796. Les cytokines sont des protéines naturelles qui assurent la communication intercellulaire et orchestrent les réponses immunitaires et inflammatoires. La surexpression des cytokines a été identifiée comme l'une des causes de l'apparition ou du développement de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses. Les médicaments, et en particulier les immunothérapies passives telles que les anticorps monoclonaux, qui bloquent l'activité d'une cytokine cible, ont récemment fait leurs preuves dans le traitement de ces pathologies. Par exemple, les produits bloquant le TNF (Tumor-necrosis factor) ont un impact majeur sur le traitement de maladies auto-immunes inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), la maladie de Crohn (CD) ou encore le psoriasis. Cependant, les approches actuelles souffrent de certaines limites : les anticorps monoclonaux ne ciblent qu'un seul épitope et ne sont pas toujours efficaces pour des cibles variables ou existantes naturellement sous forme de multiples sous-types. L'administration de protéines 'étrangères' peut générer une résistance amenant une perte d'efficacité et d'éventuels effets secondaires. Ces médicaments sont onéreux, ce qui pose des problèmes d'accessibilité, tant pour les organismes de santé que pour les patients ; ils requièrent des injections fréquentes donc contraignantes, et enfin sont susceptibles de supprimer l'activité bénéfique de la cytokine cible sur les tissus sains.

Une nouvelle stratégie d'immunothérapie active reposant sur la production, par le système immunitaire du patient, d'anticorps anti-cytokine après administration d'un candidat vaccin (cytokine cible couplée à une protéine porteuse) a été développée : Le Kinoïde. Cette administration est réalisée sous forme d'émulsion avec un adjuvant de type huileux qui induit une réponse naturelle d'anticorps polyclonaux spécifiques de la cytokine-cible, capable de neutraliser son activité pathologique.

Expérimentation animale

L'évaluation de la stimulation d'un système immunitaire (réponse humorale) ne pouvant s'effectuer que sur animaux vivants, les candidats Kinoïdes seront testés sur des souris consanguines (*Mus musculus* de l'espèce BALB/cByJ, orientées vers une réponse humorale et la production d'anticorps) afin de valider l'apparition des anticorps anti-cytokine générés au cours du protocole d'immunisation.

En accord avec les exigences de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux par groupe sera limité à 12, conférant une puissance statistique satisfaisante pour ce protocole expérimental incluant des sous-groupes de 6 souris selon le sexe. Au maximum 1800 animaux (soit 360 par an pour une durée totale du projet de 5 ans) seront utilisés. Les réponses immunes de souris mâles seront comparées à celles de souris femelles, pour évaluer d'éventuelles variations d'effets des kinoïdes liées au sexe. Les souris mâles sont séparées des souris femelles selon des groupes de cages.

Le suivi de leur comportement est réalisé quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. Les points limites sont évalués de manière à éviter toute détresse ou souffrance des animaux inclus dans le protocole. Cela inclut notamment un suivi régulier du poids des animaux, de façon à détecter une éventuelle perte de poids.

6797. Le but de ce projet est de déterminer l'effet d'un produit sur la motilité du système gastro-intestinal chez le rongeur libre de ses mouvements, par télémetrie.

Les troubles fonctionnels intestinaux représentent la plus fréquente des affections intestinales. Ils atteignent 15 à 20% de la population et débutent en général avant 30 ans. Les symptômes les plus fréquents sont des douleurs abdominales, des ballonnements et des troubles du transit intestinal. Les troubles fonctionnels intestinaux évoluent par poussée de quelques semaines ou mois. Les traitements ciblent les troubles du transit et la douleur.

La motilité gastro-intestinale est un processus physiologique très complexe. Un modèle *in vitro* ou l'utilisation de cultures de cellules ne sont pas pertinents, car le système gastro-intestinal est régulé par des nombreux paramètres dont le système nerveux autonome et le microbiote. Le protocole sur l'animal vivant est indispensable pour évaluer les effets de produits modulant ce système.

La motilité gastro-intestinale sera enregistrée à l'aide d'un système de télémetrie qui permet d'éviter de manipuler les animaux et pour réduire le stress.

Les animaux sont observés quotidiennement et les études débiteront après une période d'au moins 7 jours de récupération.

Dans un premier temps, l'effet propre d'un produit sur la motilité gastro-intestinale sera examiné. Ensuite, son effet sera étudié lors d'une perturbation de la motilité gastro-intestinale.

Le nombre d'animaux utilisé 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 3 à 5 au plus par produit, et elles sont déterminées en fonction de résultats précédents ou de données de la littérature, pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, soit 50 animaux par produit. Au maximum, 5 produits seront étudiés par an, soit 250 animaux au plus par an, et 1250 animaux au plus pour la durée maximale du projet.

Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leur besoin, avec un enrichissement adapté, un suivi quotidien de leur bien-être et l'application des points limites pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Le but de ce projet sera de déterminer l'intérêt d'un produit pour prévenir des troubles fonctionnels intestinaux, ou pour restaurer la motilité gastro-intestinale perturbée.

6798. L'imagerie joue un rôle fondamental dans l'évaluation de la réponse tumorale à la thérapie. L'intérêt majeur de cette évaluation est de déterminer rapidement l'efficacité ou l'échec d'un traitement puisqu'une réponse précoce est corrélée à un meilleur pronostic. Ainsi la détermination le plus tôt possible des bonnes et mauvaises réponses conduit à poursuivre ou à modifier le plan thérapeutique, à adapter les doses ou à changer le traitement. C'est dire l'importance de la fiabilité des méthodes d'évaluation précoce de l'efficacité des traitements. La diminution du volume de la tumeur est généralement reconnue comme l'indicateur essentiel de la réponse tumorale. Sachant que la régression tumorale peut être lente (plusieurs semaines ou même mois), l'évaluation de la réponse utilisant ces critères est généralement effectuée 6 à 8 semaines après le début du traitement. Par ailleurs, l'imagerie anatomique ne décrit

qu'un aspect de la tumeur, elle ne permet pas de rendre compte de leur vascularisation et de leur hétérogénéité (i.e. fraction de cellules proliférantes et/ou nécrosées). Il importe donc de trouver de nouvelles méthodes d'évaluation précoces permettant de fournir des paramètres dont les modifications traduisent la réponse au traitement avant la diminution du volume. Des efforts ont porté sur l'imagerie fonctionnelle telle que la tomographie par émission de positons (TEP). Cette technique est basée sur l'imagerie de biomarqueurs reflétant plus ou moins directement les effets des traitements. Malgré leur efficacité, l'utilisation de ces modalités est limitée par leur coût et la nécessité d'injecter des substances radioactives à chaque examen. L'étude proposée évaluera les performances d'un nouveau radiotracer à visée diagnostique des GIST (Tumeurs Stromales Gastro-Intestinales) pour lesquelles l'imagerie TEP n'offre actuellement pas de traceur spécifique. L'étude sera menée *in vivo* sur 70 souris (*Mus musculus*) pour évaluer la captation de ce nouveau radiotracer par les tumeurs : ce nombre nécessaire d'animaux a été calculé pour permettre une étude statistique fiable ; la méthode d'évaluation choisie (imagerie) permet de réduire ce nombre d'animaux nécessaire en permettant de suivre les paramètres d'intérêt pour chaque animal « sur la durée » (3R : Réduction). Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissements à types de copeaux, nids et tunnels (3R : Raffinement). Des points limites seront appliqués si nécessaire. Le recours à l'expérimentation animale se justifie par l'impossibilité réglementaire de conduire ce type de développement radiopharmaceutique chez l'homme sain, et le choix de l'espèce par le besoin d'évaluer les performances du traceur chez un modèle animal de GIST déjà documenté, en l'absence d'alternative possible (3R : Remplacement).

6799. Les sels de Platine (Pt) sont des composés inclus dans de nombreux protocoles de chimiothérapie, utilisés dans le traitement de nombreux cancers à un stade de diffusion dans l'organisme (stade métastatique), tels que le cancer colorectal (CRC), le cancer œsogastrique, les cancers gynécologiques, mais aussi les cancers du testicule, de la vessie, du poumon, de la prostate, des ganglions (lymphomes) ainsi que les cancers de la tête et du cou (ORL).

Au cours du traitement, les cellules tumorales mettent en place des stratégies de résistances par des processus divers et variés. Ces processus de résistance deviennent de plus en plus importants puisque les doses de chimiothérapie sont augmentées pour amplifier l'effet anti-tumoral. On aboutit alors à des tumeurs qui persistent et continuent à diffuser dans de nouveaux foyers métastatiques, empêchant la guérison et conduisant à des taux de survie très faibles. Malgré le développement de nouvelles molécules incluant du Pt, le développement de phénomènes de résistances et d'échecs de traitement restent importants, ainsi que les effets toxiques (essentiellement rénaux), sauf pour une molécule, (l'oxaliplatine), mais qui présente d'autres effets toxiques (neurologiques).

Une équipe de chimistes a développé de nouveaux complexes de Pt (NHC-Pt) ayant des effets plus importants sur des cellules tumorales résistantes à la chimiothérapie. Nous avons démontré l'efficacité supérieure de ces complexes, sur des cellules cancéreuses, comparés à une molécule de Pt actuellement utilisée en chimiothérapie. Pour pouvoir proposer ces nouvelles molécules comme agent de chimiothérapie chez l'homme des études sur des animaux sont indispensables afin de connaître leur efficacité *in vivo* (pas de remplacement possible par des études cellulaires).

Cette étude nécessitera au maximum 99 souris et 99 rats sur une période de 2 ans. Elle consistera à évaluer dans un premier temps la dose de composé à injecter selon sa distribution dans l'organisme, puis nous évaluerons la dose nécessaire pour réduire les tumeurs et son degré d'efficacité par rapport à la chimiothérapie classique.

Le nombre estimé de souris et de rats est basé sur notre expérience et expertise dans l'élaboration de ce type d'étude. Un biostatisticien sera consulté avant et au cours de chaque procédure expérimentale pour s'assurer que le nombre d'animaux utilisés, est réduit au minimum nécessaire pour l'obtention des résultats. Des mesures de raffinement seront appliquées. Les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi. Ils seront observés et surveillés quotidiennement afin de détecter rapidement tous signes de souffrance ou de douleur, qui, s'ils apparaissent, enclencherait une prescription d'antalgiques. La persistance de douleurs malgré les antalgiques conduira à l'arrêt des protocoles. Pour se rapprocher au mieux de la pathologie humaine, cible de ces nouveaux médicaments diagnostiques, une lignée de tumeurs humaines sera utilisées, nécessitant d'utiliser des souris immunodéprimées afin d'éviter un rejet des cellules humaines injectées et favoriser la croissance tumorale. Ces animaux seront hébergés dans un milieu protégé (armoire ventilée à filtre HEPA et dans des cages à couvercle filtrant), pour limiter le risque d'infection. Si les animaux présentaient une infection ou des signes de maladie sévère, le protocole serait arrêté en respectant des règles humaines. Les doses injectées de NHC-Pt seront calculées pour n'engendrer aucun effet toxique tout en permettant d'atteindre les objectifs scientifiques.

6800. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente après les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Elle se caractérise par une mort sélective des neurones moteurs situés dans le système nerveux central, par de l'atrophie musculaire et de la paralysie. Le décès des patients intervient trois à cinq ans après diagnostic.

L'axe principal de la pathologie correspond à l'axe moteur, et les principaux tissus impliqués dans la pathologie sont la moelle épinière, les nerfs moteurs et les muscles squelettiques. L'étude de l'interaction de ces 3 acteurs est la clé de la recherche sur cette pathologie.

Une partie des cas de SLA est d'origine familiale (SLAF), le plus souvent de transmission autosomique dominante. La SLAF est une maladie hétérogène, et des mutations dans plus de 10 loci sont actuellement connues pour provoquer la SLAF. Nous disposons au laboratoire d'un modèle murin de la maladie basés sur des mutations du gène *Fus*.

Nous proposons ici d'étudier le rôle de la protéine *Fus* dans la régénérescence de la jonction neuromusculaire dans notre modèle murin (*Mus musculus*) de SLA. Dans un premier temps, nous déterminerons si la réponse musculaire à la dénervation est altérée par la présence d'une mutation de *Fus*. Pour cela, nous provoquerons une dénervation totale du muscle par axotomie (12 souris contrôles et 12 souris axotomisées) et étudierons le maintien de la partie post-synaptique après lésion par une approche immunohistologique. Dans un second temps, nous procéderons à des lésions du nerf sciatique chez des animaux porteurs ou non de la mutation *Fus* (24 souris permettront d'étudier la récupération partielle après lésion et 24 souris permettront d'étudier la récupération totale après lésion).

Chez ces animaux, nous étudierons la récupération fonctionnelle par des tests moteurs et visuels reconnus et des analyses moléculaires et immunohistologiques. Les animaux seront alors mis à mort par injection d'un anesthésique générale composé de Kétamine et de Xylazine. Nous nous attendons à ce que Fus soit nécessaire à la régénérescence de la jonction neuromusculaire. Concernant les tests statistiques, nos données seront analysées par ANOVA One Way suivi d'un test de Tukey. Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de limiter le nombre d'animaux et d'améliorer leur bien-être. La complexité des unités motrices et l'implication de plusieurs types cellulaires excluent l'utilisation de modèles cellulaires et rendent incontournable l'utilisation de modèle animaux. L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales, une surveillance quotidienne, ainsi que le recours à une analgésie post-opératoire permettront de limiter la souffrance des animaux et de s'assurer de leurs bien-être.

6801. Le cancer du rein compte 338 000 nouveaux patients et 143 000 décès par an (2012). Il est représenté à 90 % par le carcinome à cellules rénales claires (CCC) qui trouve son origine au niveau des tubules proximaux du rein. Dans 70% des CCC, on retrouve une inactivation du gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL). Le CCC est réfractaire à toutes les thérapies actuelles d'où la nécessité de développer de nouvelles options thérapeutiques.

De nombreux travaux révèlent des similitudes mécanistiques entre la tumorigenèse rénale et la néphrogenèse. Récemment, le facteur développemental Lim-1, cible de la voie Sonic hedgehog a particulièrement retenu l'attention. Il est exprimé très tôt au cours de l'embryogenèse et est impliqué dans la formation des tubules proximaux rénaux où le CCC trouve son origine. Des résultats récents l'ont identifié comme un nouvel oncogène dans le CCC. Par ailleurs, des résultats préliminaires montrent que Lim-1 favorise les mouvements cellulaires *in vitro* (invasion/migration) en régulant l'expression des protéines impliquées dans ces processus. Il a été également montré exprimé dans des échantillons métastatiques de CCC. Sur la base de ces travaux, l'hypothèse a donc été émise que Lim-1 pourrait être impliqué dans la dissémination métastatique du CCC.

Notre objectif général est d'étudier le rôle de Lim-1, codé par le gène *Lhx1*, dans le cancer du rein avancé et donc dans l'invasion métastatique, stade affectant plus de la moitié des patients. Afin d'atteindre cet objectif, il est nécessaire de développer un modèle *in vivo* original chez la souris Nude permettant le développement de métastases visualisables à l'imagerie et l'inhibition conditionnelle de Lim-1 dans le but de définir son implication à différentes étapes du processus métastatique.

Pour ce projet, la règle des 3R sera respectée de la façon suivante :

- Remplacement

Dans le cadre de ce projet, nous proposons d'élucider le rôle du facteur développemental Lim-1 dans les différentes phases du processus métastatique du CCC. Ceci implique incontestablement une étude *in vivo* et l'utilisation de modèles animaux. En effet, il n'existe pas de techniques *in vitro* permettant d'étudier le développement/la croissance métastatique. Par conséquent, aucune méthode de remplacement n'est envisageable.

- Réduction

Le nombre total de souris nécessaire pour ce projet est entre 174 et 183 (Voir Annexe 1) en tenant compte d'un pourcentage de prise de greffe de près de 90%. Nous utiliserons un nombre minimal d'animaux permettant d'une part, une analyse statistique des résultats (Kruskal-Wallis one-way Anova) et d'autre part, d'obtenir assez de matériel pour les analyses ultérieures nécessaires à la caractérisation du rôle de Lim-1 dans le processus métastatique.

Des études pilotes seront conduites avec un nombre minimal de souris avant de commencer l'étude proprement dite afin de réduire le nombre d'animaux sacrifiés en cas d'échec de la procédure.

- Raffinement

La douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux liées à leur manipulation seront réduites au minimum grâce au respect des conditions d'hébergement et à la formation du personnel. En effet, ce projet sera réalisé au sein d'une animalerie agréée et par conséquent les animaux seront manipulés par du personnel habilité et soucieux de leur bien-être. Le raffinement sera assuré par un enrichissement des cages pour le confort des animaux. Les souris seront nourries *ad libitum* et hébergées en groupe ; elles ne seront séparées qu'en cas de comportement agressif.

Par ailleurs, nous diminuerons la douleur et l'anxiété liées à tout acte chirurgical en opérant sous anesthésie et en appliquant une analgésie locale au point de suture. Les animaux seront surveillés pendant toute la phase de réveil et quotidiennement pendant tout le temps du projet. De plus, un traitement antalgique leur sera administré au moment du réveil et aussi pendant l'étude si les souris manifestent des signes de détresse relatifs aux douleurs chroniques liées au développement des métastases.

6802. Nous étudions des dispositifs génétiques qui intègrent la réalisation de nouvelles voies métaboliques « sur mesure » pour traiter des pathologies courantes telles que le diabète, l'obésité, l'hypertension, le psoriasis, etc. Chaque dispositif cible une pathologie donnée et l'expression du gène et de la protéine physiologique d'intérêt (insuline, leptine, etc...) est provoquée par l'administration d'un inducteur spécifique d'origine alimentaire ou médicamenteuse. Dans le projet précédent, nous avons montré la fonctionnalité par injection intrapéritonéale, chez la souris, de ces dispositifs génétiques intégrés dans une cellule de mammifère, elle-même enfermée dans une capsule d'alginate. La fonctionnalité de ces cellules de mammifère modifiées, stables, est testée préalablement sur culture cellulaire. Dans le projet actuel, nous souhaitons tester la fonctionnalité de ces mêmes cellules mais confinées dans un implant biocompatible souple dont les membranes sont perméables et qui sera placé en sous-cutané chez la souris préalablement anesthésiée. L'utilisation de cet implant, mis au point et testé chez la souris adulte, a permis d'augmenter la concentration de cellules et d'en prolonger la durée de vie. Cette technique d'implant vise à plus long terme l'ouverture de nouvelles voies thérapeutiques chez l'Homme. Nous souhaitons, valider la fonctionnalité de l'implant *in vivo*, par comparaison aux résultats obtenus précédemment avec les cellules encapsulées, afin de l'utiliser dans les protocoles ultérieurs. Pour atteindre les objectifs de notre projet, nous ne pouvons pas faire autrement qu'utiliser des animaux vivants. Les inducteurs sont testés sous une seule dose,

par voie orale ou transcutanée (patch adhésif à diffusion lente) à raison d'un traitement par 24 h pendant 48 ou 72 h selon les protocoles. Un prélèvement sanguin est effectué au niveau du sinus rétro-orbitaire des souris anesthésiées, 48 heures après la pose des implants, puis une semaine après. Les sérums collectés sont congelés à -40°C en vue du dosage des marqueurs d'intérêt. Chaque protocole type utilise 32 souris réparties en 4 lots de 8 souris et 3 protocoles sont réalisés en moyenne par an, soit 96 souris au total. Ce nombre de souris est calculé au plus juste pour interpréter statistiquement les résultats (test t de Student). Cette nouvelle technique permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le groupe témoin est réutilisé en séance de travaux pratiques de physiologie ou pharmacologie. Le placement des implants en sous-cutané et les prélèvements de sang en rétro-orbitaire seront faits sur souris anesthésiées.

6803. L'utilisation des animaux de laboratoire dans les procédures faiblement invasives et invasives est strictement encadrée par la loi. La bonne pratique d'expérimentation nécessite une bonne connaissance de la biologie des espèces utilisées et aussi la connaissance théorique et pratique des méthodes d'exploration sur le modèle animal. L'objectif de ce projet est de fournir des connaissances indispensables et d'enseigner les bonnes pratiques d'expérimentation animale.

Cette formation s'adresse :

- aux responsables scientifiques concevant les procédures expérimentales,
- aux personnes réalisant les procédures expérimentales,
- ainsi que dans certains cas aux personnes chargées de soin aux animaux.

Notre société organise chaque année 6-12 sessions de formations inter- ou intra-entreprise.

Il s'agit des formations suivantes :

- la formation de base en chirurgie expérimentale
- la formation en gestion clinique et en gestion du bien-être animal.

Ces formations sont axées sur les rongeurs de laboratoire.

Afin d'enseigner les bonnes pratiques d'expérimentation animale, l'utilisation des animaux est encadrée par le vétérinaire spécialisée en animaux de laboratoire. Le support artificiel est utilisé pour l'apprentissage de techniques de suture.

Les formations nécessiteront au maximum 1080 rongeurs sur 5 ans, soit 15 à 18 rongeurs par session et 3 animaux pour chaque apprenant. De plus, pour éviter la souffrance des animaux, toutes les procédures faiblement invasives et invasives seront pratiquées sous l'anesthésie générale. Les animaux utilisés seront mis à mort sous anesthésie à la fin des procédures.

6804. Malgré des efforts considérables pour lutter contre le cancer et trouver un traitement efficace, cette pathologie reste l'une des principales causes de décès chez l'homme dans le monde et en France. La majorité des approches pour traiter le cancer ont été élaborées sur la base d'études cellulaires *in vitro*. Malheureusement, elles se sont révélées infructueuses pour de nombreux types de cancers. En effet, ces techniques ne permettent pas à ce jour, de mimer efficacement le développement tumoral à l'échelle d'un organisme entier. Nous aurons recours à l'animal afin d'étudier le comportement tumoral dans des conditions proches de celle observées en clinique (conditions physico-chimiques et physiologiques, interactions cellulaires et moléculaires à l'échelle de l'organisme).

Nos modèles d'études seront mis au point chez la souris. Il s'agit de l'espèce la plus largement utilisée en recherche du développement tumoral. Cela permettra un comparatif de nos résultats à ceux disponibles dans la bibliographie au niveau international. Notons également que cette espèce est facilement manipulable, et permet un bon suivi du développement tumoral (mesures, observations visuelles...).

Il existe de nombreux modèles murins très largement utilisés pour comprendre le développement du cancer et sa réponse aux traitements. Cependant il est difficile d'attribuer une cinétique au développement cancéreux *in-situ* chez la souris, ce qui rend difficile l'analyse du développement initial du cancer. De plus, les cancers murins ne se comportent pas forcément comme les cancers humains. Ceci est un détail de haute importance dans l'analyse de la réponse aux traitements et de la récurrence. Pour pallier cette différence inter-espèce, des cancers primaires humains (issus de patients) peuvent être injectés à des souris immunodéprimées, chez lesquelles ils peuvent se développer et être analysés (tant au niveau du développement initial que de la réponse aux traitements anticancéreux).

Pour ce projet, nous mettrons au point des modèles xénogreffes de cellules tumorales humaines sur des souris immunodéprimées *Nude* (xénogreffe). Cette souche immunodéprimée permettra d'optimiser la prise de la greffe et de limiter les risques de rejet (réduction du nombre d'animaux). Nous établirons différents modèles de cancers primaires humains qui pourront être utilisés par la suite pour de plus amples recherches et études précliniques.

Afin de suivre les cellules tumorales et leur résistance aux traitements dans la souris receveuse, ces cellules seront modifiées avant leurs injections en introduisant un gène produisant une protéine fluorescente (activation par injection intrapéritonéale de Tamoxifène). Cette spécificité sera conservée par les tumeurs lors de leurs passages successifs, permettant ainsi de suivre le développement des tumeurs et d'étudier leurs réponses aux traitements.

Intégration des 3Rs :

Remplacer : L'utilisation de "tumorsphères" est une méthode de remplacement pour l'étude des cellules souches cancéreuses. Nous l'envisagerons aussi souvent que possible. Cependant, ces cultures *in vitro* ne récapitulant pas toute la complexité de l'organisme, nous devons avoir recours à des animaux pour certaines étapes de nos recherches.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés permettra l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons des lots de 6 souris par groupe. Nous utiliserons un maximum de 2084 animaux pour toute la durée du projet. Raffiner : Toutes les expériences

et manipulations des animaux seront effectuées dans le respect de la réglementation européenne en cours afin de préserver le bien-être de l'animal et de réduire au minimum leur niveau de stress.

1) les animaux seront observés quotidiennement. 2) un examen clinique individuel sera réalisé minimum 2 fois par semaine à l'aide d'une grille de score adaptée au modèle, permettant de suivre l'état de santé de l'animal et le développement tumoral. La fréquence de ces examens pourra être intensifiée en fonction du stade et du type de cancer, ainsi que de l'âge de la souris. 3) Des points limites ont été définis afin d'anticiper toute souffrance à l'animal. 4) Par soucis de respect de la hiérarchie de l'espèce, les groupes expérimentaux seront formés au moment du sevrage, et conservés intacts jusqu'à ce que les animaux soient utilisés pour la reproduction. 5) Les animaux ont un accès ad libitum à l'eau et à la nourriture et sont hébergés en portoirs ventilés pour les préserver des pathogènes. 6) Les cages sont enrichies à l'aide de matériaux permettant l'expression des besoins comportementaux et physiologiques de l'espèce.

6805. Le règlement 1099/2009/CE sur la protection des animaux au moment de leur mise à mort impose pour l'euthanasie des poulets des paramètres électriques minimaux (100 mA pour une fréquence inférieure à 200 Hz, 150 mA pour une fréquence comprise entre 200 et 400 Hz et 200 mA pour une fréquence comprise entre 400 et 1500 Hz). Cependant ces paramètres électriques peuvent induire la mort de l'animal avant la saignée ce qui peut avoir comme conséquence une mauvaise saignée de l'animal et donc des problèmes de qualité de carcasse. Par ailleurs, les établissements pratiquant l'abattage religieux peuvent déroger à l'obligation d'étourdissement préalable à la mise à mort (arrêté du 28 décembre 2011).

L'objectif de notre étude est d'optimiser les paramètres électriques en vue d'aider les professionnels à trouver le meilleur compromis entre la protection animale à l'abattoir et l'application du cahier des charges dans le cadre d'abattages rituels, tout en ayant une bonne qualité des produits finaux, afin de préserver leur compétitivité. Par ailleurs, outre les paramètres électriques, d'autres facteurs seront étudiés car ils interviennent également dans la qualité de l'étourdissement et le maintien de la qualité des produits (temps d'application des paramètres électriques, sexe, poids et engraissement des animaux). Afin d'apprécier l'efficacité d'étourdissement et la qualité des produits (carcasse), des grilles de notation seront utilisées. Un essai sera réalisé afin de répondre à notre objectif qui est de définir un couple fréquence/ intensité, avec 10 secondes d'exposition, pour l'étourdissement par bain d'eau électrifié des poulets standard ; cela permet à la fois d'assurer l'inconscience des animaux, de l'étourdissement jusqu'à leur mort tout en respectant les obligations liées à l'abattage rituel (poulet pouvant potentiellement recouvrer la conscience peu après la saignée) où la mort de l'animal doit être une conséquence de la saignée et non de la méthode d'étourdissement.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer le poulet par une autre espèce ou par des mesures *in vitro* car chaque espèce aura une réponse différente face au procédé d'électronarcose et que l'objectif de l'étude est de définir les paramètres électriques pour l'espèce poulet Réduire : Les effectifs de notre projet sont de 432 animaux. Ces effectifs ont été réduits au maximum et ont été calculés afin d'être en mesure de mettre en évidence statistiquement des différences jugées biologiquement significatives notamment sur l'inconscience des animaux.

Raffiner : Au cours de l'expérimentation, l'inconscience des volailles sera vérifiée en continu, et un traitement non satisfaisant en termes d'étourdissement, sera interrompu pour éviter une souffrance inutile aux animaux.

6806. Le cancer du sein est un cancer dont certaines formes demeurent résistantes aux traitements et de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être développées.

Notre projet vise à évaluer chez la souris *Nude* porteuse de xénogreffes de cellules de cancer du sein humaines rendues bioluminescentes, des formulations liposomales ciblant un récepteur membranaire et ayant incorporé soit un petit ARN interférent dirigé contre le gène de la luciférase (surexprimée par les cellules tumorales) soit une petite molécule hydrophobe.

Le développement d'un nouveau nano-médicament nécessite la mise en place d'expériences chez le rongeur car la distribution du médicament et sa toxicité éventuelle doivent être analysées dans un organisme entier. Les animaux ont un rôle inestimable en recherche expérimentale car ils permettent de mener des recherches concernant un médicament potentiel en amont de son utilisation chez l'Homme. Ce projet fait suite à un travail important *in vitro* utilisant des cellules en culture qui nous a permis de rechercher les conditions optimales de mise en œuvre de ce projet d'expérimentation chez l'animal.

Une première partie de l'expérience portera sur la mise au point du modèle bioluminescent, modèle qui permet des analyses non invasives des volumes tumoraux grâce à l'imagerie : plusieurs quantités de cellules tumorales permettront de déterminer le nombre optimal de cellules bioluminescentes qu'il nous faudra injecter dans les coussinets graisseux des souris pour obtenir des tumeurs suffisamment bioluminescentes mais d'un volume compatible avec l'ensemble de la chronologie de l'expérience. Lors du geste chirurgical peu invasif, la lidocaïne sera utilisée comme anesthésique local en plus de l'isoflurane, anesthésique général gazeux. L'évolution de la tumeur sera observée 2 fois par semaine après l'injection des cellules en administrant par voie intrapéritonéale la luciférine, substrat de la luciférase. L'état général des souris et le volume tumoral seront contrôlés très régulièrement et les actions de lutte contre la douleur ou l'inconfort pourront être mises en place le cas échéant.

La seconde étape consistera à évaluer l'efficacité des liposomes sur l'extinction intra-tumorale de la luciférase : un calcul statistique nous permet de définir un nombre minimum de souris qui sera utilisé pour cette étape de projet afin d'obtenir des résultats interprétables du ciblage tumoral des liposomes et spécificité d'action du siRNA. Après le temps de croissance tumorale suffisant, déterminé lors de la première expérience, les souris seront traitées par voie intraveineuse (1 ou deux fois par semaine) avec les différentes formulations et l'extinction de l'activité luciférase sera observée tous les 2-3 jours pendant 15 jours.

Enfin, la troisième expérience cherchera à mettre en évidence l'efficacité anti-tumorale des liposomes chargés en molécule active. Pour cela, un groupe de tumeurs contrôles ne recevant pas de liposomes sera nécessaire et un groupe pour chaque type de liposomes, nus ou décorés, chargés ou non chargés en principe actif. Là encore, un calcul statistique nous permet d'établir un nombre minimum

de souris qui seront utilisées pour cette étape de l'expérience. Les traitements seront réalisés par voie intraveineuse une ou deux fois par semaine en fonction de la tolérance des souris vis-à-vis de ces traitements).

Ainsi, pour l'ensemble de nos procédures, le nombre d'animaux utilisés sera de 350 souris *Nude* femelles adultes.

La croissance tumorale sera évaluée 2 fois par semaine et dès qu'un point limite sera atteint, la manipulation sera stoppée. Une fois par semaine, des prélèvements sanguins seront effectués afin de contrôler la toxicité (hépatique en particulier) de nos formulations.

6807. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare, complexe et progressive affectant les artères pulmonaires, très grave puisque les patients décèdent dans les 3 à 5 ans après le diagnostic. Ces artères se retrouvent bouchées, suite à une inflammation et à des micro-caillots (micro-thromboses), entraînant une dysfonction de la paroi des vaisseaux, une vasoconstriction et un remodelage des cellules vasculaires qui prolifèrent de façon anarchique. Il s'en suit une augmentation des pressions pulmonaires, une surcharge du cœur droit et finalement une défaillance cardiaque et la mort. Actuellement il n'y a pas de solution pour guérir la maladie ; on traite les symptômes, ou alors on a recours à la transplantation combinée cœur-poumon. Le pronostic est donc bien différent de l'hypertension systémique, celle que l'on mesure avec un brassard, et que l'on peut équilibrer par des médicaments.

La thrombose participe à l'occlusion des vaisseaux et à l'inflammation, et pourrait déclencher tout le processus pathologique. Il a été démontré récemment que des médicaments anti-thrombotiques ont amélioré l'état des patients avec une maladie déjà établie, sans que le mécanisme mis en jeu soit bien compris. Les plaquettes participent à la formation de ces micro-thromboses, et nous avons mis en évidence un mécanisme par lequel ces plaquettes libèrent des médiateurs qui pourraient déclencher le processus de remodelage, en agissant sur un récepteur des cellules vasculaires (nommé récepteur NMDA). Une étude *in vivo* chez la souris, montre que le blocage de ces récepteurs NMDA diminue de manière significative la réaction inflammatoire initiée par les plaquettes dans les greffes de peau et améliore les taux de survie des greffes. Nous formulons une hypothèse de travail similaire dans l'HTAP : les plaquettes pourraient participer à la formation de microthromboses, dont l'interaction avec la paroi vasculaire via le récepteur NMDA, pourrait déclencher le processus d'occlusion des vaisseaux pulmonaires, et les conséquences dramatiques qui s'en suivent. Ce récepteur pourrait être une cible de médicament pour empêcher le développement et la progression de la maladie. Notre objectif est d'explorer le rôle des plaquettes et du récepteur NMDA dans développement de l'HTAP à la fois *in vitro* et dans des modèles animaux *in vivo*. L'utilisation des animaux dans ce projet est justifiée. Afin de satisfaire la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), nous avons prévu des expériences *in vitro* mettant en jeu le contact entre les cellules endothéliales de la paroi vasculaire et les plaquettes. Cependant l'HTAP est une maladie complexe mettant en jeu des organes comme le poumon, et en conséquence le cœur, il est donc indispensable d'utiliser des animaux pour faire la preuve de concept de l'implication de ces mécanismes dans la maladie. Le nombre d'animaux est calculé au minimum pour atteindre la significativité statistique. Nous utiliserons des rats, qui représentent un modèle expérimental admis de l'HTAP. Le nombre de rats prévu est fixé à 384. Les groupes expérimentaux seront de 10 rats pour tenir compte de la variabilité expérimentale. Les animaux seront hébergés à raison de 2-3 par cage en fonction de leur poids. La nourriture et l'eau seront données à volonté et en permanence. Chaque jour, les animaux seront inspectés pour repérer des signes de douleur et les symptômes de la maladie. La température ambiante et l'humidité de la salle d'hébergement des animaux seront surveillées et sont déterminées selon les directives en vigueur. En cas de douleur induite par une plaie superficielle (plaie cutanée, blessure), la zone lésée sera traitée localement par une crème analgésique après désinfection et après suture de la plaie sous anesthésie (Isoflurane 2-3%). Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie.

Les perspectives de ce projet sont doubles ; nous espérons 1) comprendre comment la maladie se développe et progresse avec ces mécanismes liés à la microthrombose et 2) proposer à terme une solution thérapeutique ciblant le récepteur NMDA dans son rôle de communication entre les plaquettes et les cellules vasculaires endothéliales.

6808. La maladie vasculaire artérielle périphérique (MVAP) est une affection impliquant une obstruction des artères périphériques, le plus souvent celles des jambes. La MVAP est provoquée par une athérosclérose (durcissement des artères) ou par des lésions artérielles. Des plaques de fibres, des dépôts de calcium ou de cholestérol peuvent s'implanter dans les artères rétrécies ou présentant des lésions et être à l'origine d'obstructions. La MVAP est une maladie fréquente atteignant environ 12 % de la population âgée de plus de 60 ans ; ses deux manifestations principales cliniques sont : la claudication intermittente et l'ischémie critique.

L'ischémie critique constitue une urgence vasculaire. L'objectif premier du traitement de l'ischémie critique est d'éviter la perte du membre atteint en proposant une revascularisation chirurgicale ou une angioplastie transluminale percutanée. Il existe également un traitement pharmacologique, soit un analogue de la prostaglandine E1, dont l'efficacité se manifeste essentiellement par un soulagement de la douleur et un retard de l'amputation. Compte tenu de son coût et de son efficacité mitigée, ce traitement n'est réservé qu'aux patients représentant un très haut risque chirurgical et pour qui l'amputation ne constitue pas une solution raisonnable. Depuis quelques années, la stimulation de l'angiogénèse est devenue une voie thérapeutique majeure dans le traitement de l'ischémie critique et de nombreux essais sont en cours. Le but de cette étude est de transférer un modèle d'ischémie de la patte postérieure développé au laboratoire chez la souris obèse vers une souris immunodéprimée (*NSG*). Suite à une ischémie, de nombreux acteurs moléculaires et cellulaires concourent pour promouvoir la revascularisation post-ischémique afin de limiter les lésions tissulaires. Des cellules progénitrices et inflammatoires originaires de la moelle osseuse sont notamment recrutées au niveau du tissu ischémique où elles activent et participent à la régénération vasculaire et tissulaire. Leurs capacités pro-angiogéniques et pro-vasculogéniques suscitent d'ailleurs un grand intérêt pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'utilisation d'une souris immunodéprimée permettra de tester l'efficacité potentielle de cellules souches humaines (xénogreffe) possédant un potentiel pro-angiogénique et pro-vasculogénique sur ce modèle d'ischémie.



Le projet comprend une phase de mise au point du modèle sur 15 animaux, nombre minimal pour évaluer la faisabilité et la pertinence du modèle puis une phase d'évaluation de l'efficacité de cellules souches humaines sur le modèle caractérisé. Cette seconde phase comprendra au maximum 325 animaux afin de tester plusieurs doses et formulations des cellules souches. Les animaux fortement immunodéprimés sont hébergés en portoirs ventilés, et ne sont manipulés que dans un environnement hautement confiné. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

6809. La dégradation de l'habitat via notamment l'intensification et la spécialisation de l'agriculture ces dernières décennies ont conduit au déclin de certaines espèces, comme le Grand hamster (*Cricetus cricetus*), rongeur présent dans la plaine agricole de notre région et strictement protégé. Un programme européen prévoit six actions afin d'identifier, de tester, d'évaluer et de diffuser la pertinence de pratiques agricoles pérennes et favorables au Grand hamster (*Cricetus cricetus*). L'une de ces actions (expérimenter en milieu ouvert les pratiques agricoles les plus prometteuses) consiste à mettre en place sur des parcelles expérimentales des pratiques agricoles améliorées, comme par exemple, semer une interculture précoce dans un blé moissonné.

Afin d'évaluer le bénéfice de ces pratiques pour le Grand hamster, il est prévu de capturer et marquer des individus sauvages et de les suivre afin de déterminer les paramètres de survie et de reproduction. Cette expérimentation fait partie d'un autre projet soumis à demande d'autorisation (évaluation de pratiques agricoles plus prometteuses pour le Grand hamster (*Cricetus cricetus*) via le suivi individuel d'adultes capturés in situ). Dans le cas où l'effectif capturé et marqué ne serait pas suffisant pour évaluer la qualité du couvert des pratiques améliorées, 80 femelles marquées issues d'élevage pourront être relâchées (avec d'autres hamsters non marqués) sur des parcelles dépourvues de hamster : 40 en 2016 et 40 en 2017. Cet effectif (80 animaux) sera réparti sur une ou plusieurs parcelles conduites en pratique conventionnelle et une ou plusieurs parcelles conduites en pratique améliorée. Préalablement au lâcher en juin, les parcelles seront clôturées. Cette protection contre les prédateurs terrestres sera enlevée à la moisson du blé (en juillet), car il s'agit d'évaluer l'effet d'une interculture sur la survie et la reproduction après moisson.

Le suivi télémétrique permettra d'étudier le déplacement et la survie des individus marqués. Couplé à un dispositif de pièges photographiques, il sera également possible d'estimer le taux de reproduction des femelles (nombre de portées et nombre minimum de jeunes par portée). De plus, selon l'émetteur employé, il sera possible de mesurer la température interne des individus pendant la phase d'hibernation.

La règle des 3R a été prise en compte lors de l'élaboration du protocole expérimental. Celui-ci ne prévoit aucune euthanasie. L'étude se place dans le contexte de conservation du hamster d'Europe (étude du comportement de l'animal en milieu naturel) et ne peut donc pas se faire sur une autre espèce. Le nombre d'animaux (80) a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiques fiables. Toutes les mesures seront prises pour limiter le stress (cages de transport appropriées) et la douleur (utilisation d'antidouleurs).

6810. Ce projet s'inscrit dans une série de tests et de stratégies réglementaires permettant l'évaluation de la toxicologie génétique des substances d'essai.

Les altérations génétiques dans les cellules somatiques peuvent s'accumuler et conduire au cancer ou à des dégénérescences tissulaires. Dans les cellules germinales, ces altérations peuvent conduire à des avortements spontanés, de l'infertilité ou des anomalies génétiques transmises à la descendance.

Le test du micronoyau *in vivo* est un test de toxicologie génétique qui permet de mettre en évidence le potentiel d'une substance à induire des lésions cytogénétiques. Ces lésions peuvent être de type structurale lorsque la substance induit des cassures chromosomiques conduisant à la perte de fragments de chromosomes (substance interagissant directement avec l'ADN), ou numérique lorsqu'elle induit la perte de chromosomes entiers (substance interagissant avec l'appareil mitotique). Dans les 2 cas, les cellules subissent des altérations importantes et irréversibles de leur intégrité génétique. En effet, les fragments de chromosomes ou chromosomes entiers ne sont alors pas répartis équitablement dans les cellules lors de la mitose. Comme ils ne sont pas intégrés au noyau principal, ces fragments ou chromosomes entiers forment des micronoyaux dans les cellules interphasiques.

Lorsqu'un érythroblaste se transforme en érythrocyte immature, le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal.

Le test est pratiqué chez des mammifères. Le rat et la souris sont les espèces les plus couramment utilisées et recommandées par la ligne directrice OCDE No. 474 décrivant la réalisation du test.

Les animaux sont exposés à la substance d'essai habituellement par gavage ou par injection intraveineuse.

La détection des lésions cytogénétiques résultant de l'action d'une substance d'essai est permise par l'analyse des érythrocytes prélevés dans le sang périphérique ou la moelle osseuse des animaux euthanasiés au(x) moment(s) approprié(s) après le traitement. Les érythrocytes micronucléés nouvellement formés sont identifiés et dénombrés, une fois colorés, par examen visuel au microscope ou par analyse automatique. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite.

En raison de la complexité que représente un organisme vivant (notamment les facteurs du métabolisme *in vivo*, la pharmacocinétique et les processus de réparation de l'ADN), il n'existe pas à ce jour de méthode alternative *in vitro* pouvant remplacer ce test à l'identique.

Le nombre d'animaux utilisé est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes d'un point de vue statistique et ainsi d'atteindre tous les objectifs de l'étude. Le nombre d'animaux est estimé à 4000 sur 5 ans.

Cette procédure expérimentale peut parfois être incluse au sein d'une étude de toxicologie chronique, ce qui réduit fortement le nombre d'animaux utilisés.

Les animaux sont hébergés en groupe (par défaut), dans des cages respectant les dimensions réglementaires, et en présence d'enrichissement environnemental. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort ou souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

6811. La dégradation de l'habitat via notamment l'intensification et la spécialisation de l'agriculture ces dernières décennies ont conduit au déclin de certaines espèces, comme le Grand hamster (*Cricetus cricetus*). Un programme européen prévoit six actions afin d'identifier, de tester, d'évaluer et de diffuser la pertinence de pratiques agricoles pérennes et favorables au Grand hamster (*Cricetus cricetus*). L'une de ces actions (Expérimenter en milieu ouvert les pratiques agricoles les plus prometteuses) consiste à mettre en place sur des parcelles expérimentales des pratiques agricoles améliorées, comme par exemple, semer une interculture précoce dans un blé moissonné ou encore, sous semer un maïs à travers un couvert de trèfle.

Afin d'évaluer le bénéfice de ces pratiques pour le Grand hamster en 2016 et 2017, un maximum de 100 femelles adultes sauvages seront capturées et marquées entre avril et mai et 60 mâles adultes sauvages seront également capturés et marqués (sur 2 années) tout au long de la saison d'activité (avril-octobre) en 2016 et 2017 afin de les suivre par télémétrie. Ce suivi permettra d'étudier leur déplacement et leur survie. Couplé à un dispositif de piège photographique, il sera également possible d'estimer le taux de reproduction des femelles (nombre de portées et nombre minimum de jeunes par portée). De plus, selon l'émetteur employé, il sera possible de mesurer la température interne des individus pendant la phase d'hibernation.

La règle des 3R a été prise en compte lors de l'élaboration du protocole expérimental. Celui-ci ne prévoit aucune euthanasie. L'étude se place dans le contexte de conservation du hamster d'Europe (étude du comportement de l'animal en milieu naturel) et ne peut donc pas se faire sur une autre espèce. Le nombre d'animaux a été optimisé afin d'obtenir des résultats statistiques fiables (100). Toutes les mesures seront prises pour limiter le stress (cages de transport appropriées) et la douleur (utilisation d'antidouleurs).

6812. Depuis quelques années, on découvre que les bactéries du tube digestif jouent un rôle sur le comportement de l'hôte, ce qui a conduit à parler d'axe microbiote-intestin-cerveau. Par exemple, durant des tests d'anxiété, des rongeurs élevés sans bactéries dans un environnement stérile (animaux axéniques) exprimaient des comportements différents des rongeurs élevés normalement en présence de bactéries. De plus, chez les rongeurs et chez l'Homme l'apport alimentaire de probiotiques (c'est-à-dire de bactéries qui, administrées en quantité suffisante, sont bénéfiques pour la santé de l'hôte) réduit les comportements anxieux et certaines altérations du comportement social.

Par ailleurs, les études réalisées chez l'Homme et les rongeurs montrent que le microbiote intestinal du jeune (microbiote intestinal initial) a une importance déterminante sur la composition du microbiote intestinal de l'adulte. Cependant, contrairement aux mammifères, les études sur le sujet manquent cruellement chez le modèle oiseau alors que l'amélioration du microbiote intestinal pourrait être une nouvelle voie d'amélioration de l'élevage des volailles.

En conséquence, nous formulons l'hypothèse que le microbiote intestinal initialement implanté dans le tube digestif de la caille japonaise a des conséquences à court et long terme sur ses comportements émotionnels.

Chaque groupe recevra un microbiote différent et sera hébergé dans un isolateur stérile afin d'éviter le développement d'autres bactéries que celles provenant du donneur. Pour réaliser le transfert de microbiote, les cailles recevront par voie orale, une quantité du contenu caecal d'un donneur adulte. Les animaux seront sortis des isolateurs à l'âge de 5 semaines (lorsque la composition du microbiote intestinal est stabilisée). Tout au long de l'expérience, nous réaliserons, sur nos 4 groupes, des mesures de l'activité spontanée, des comportements émotionnels (test d'immobilité tonique, test d'openfield), des mesures de croissance et de réponses physiologiques au stress (réactivité de l'axe corticotrope).

Au final 129 cailles seront utilisées dans ce projet, 54 (3x18) pour l'expérience 1 et 72 (4x18) pour l'expérience 2 et 3 cailles donneuses, (1 pour l'expérience 1 et 2 pour l'expérience 2).

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

Réduction : Pour éviter d'utiliser un grand nombre d'animaux inutilement, le projet est divisé en deux expériences. L'expérience 1, préliminaire, permettra de mesurer les effets à court et long terme sur les comportements émotionnels de l'échange de flore intestinale sur une seule lignée. Si les résultats sont satisfaisants, nous entamerons l'expérience proprement dite (expérience 2).

Raffinement : Les animaux seront élevés en isolateur sur copeaux. Un enrichissement pourra être apporté par l'apport lors de jours successifs d'objets nouveaux préalablement stérilisés et dissimulés dans l'isolateur. Les animaux resteront en groupe et seront surveillés deux fois par jour. Toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans le point limite engendrera l'arrêt de l'expérience pour l'animal en question.

6813. Buts du projet: Le but de ce projet est de réaliser des modèles murins de carcinomes hépatocellulaires (tumeurs malignes du foie) pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces tumeurs, et mettre en place des essais thérapeutiques précliniques chez la souris qui permettront de valider de nouvelles thérapies et des facteurs prédictifs de leur efficacité. Conformément aux nouvelles réglementations, les différentes procédures expérimentales ont été conçues dans le respect de la règle des 3R :

1) Remplacer : les expériences ont été choisies sur la base de résultats expérimentaux préalablement obtenus dans des modèles *in vitro*. Nous envisageons de développer deux types de modèles: 1) des modèles de souris génétiquement modifiées mimant les altérations génétiques identifiées dans les tumeurs humaines pour mieux comprendre le rôle de ces altérations dans les différentes

étapes du développement de la maladie ; 2) des modèles de xénogreffes de lignées cellulaires cancéreuses humaines sauvages ou génétiquement modifiées et des xénogreffes de tumeurs directement dérivées de pièces opératoires de patients qui représentent actuellement les modèles les plus pertinents pour étudier la réponse thérapeutique et les facteurs moléculaires qui influencent cette réponse.

2) Réduire : le nombre d'animaux nécessaires aux différentes procédures a été estimé au minimum mais de manière à garantir l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ce nombre prend en compte, pour les différentes procédures expérimentales : le maintien des lignées génétiquement modifiées, les groupes étudiés, les groupes contrôles et les animaux nécessaires à la mise au point des procédures expérimentales. Le nombre de souris nécessaires pour les différentes procédures expérimentales est estimé à 1021 souris :

- Procédure n°1/2 : élevage de souris génétiquement modifiées en vue d'obtenir des tumeurs hépatiques, n=464

- Procédure n°3 : induction de tumeurs hépatiques par modifications génétiques introduites par injection d'ADN nu dans la veine caudale, n=250

- Procédure n°4 : xénogreffes de tumeurs primaires, n=147

- Procédures n°5/6 : xénogreffes de lignées tumorales hépatiques humaines et administration de substances pharmacologiques, n=160

3) Raffiner : nous avons défini des points limites d'expérimentation à partir desquels les expériences seront interrompues pour veiller au bien-être des animaux. Les animaux manifestant des signes cliniques de souffrance seront euthanasiés par dislocation cervicale. Pour les procédures susceptibles d'engendrer une douleur, les animaux seront anesthésiés. Contributions potentielles de cette étude à la biologie et à la médecine humaine et animale : ce projet de recherche devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de coopération entre oncogènes (gènes favorisant l'apparition des tumeurs) et gènes suppresseurs de tumeurs spécifiques dans l'induction de carcinomes hépatocellulaires mais aussi de valider de nouvelles thérapies, et des facteurs moléculaires prédictifs de leur efficacité. Ces connaissances permettront de mieux orienter les essais cliniques chez l'homme en facilitant la sélection de sous-groupes de patients susceptibles de répondre à un médicament spécifique.

6814. Avec une incidence d'environ 60 à 70%, les troubles du sommeil sont très fréquents chez les parkinsoniens. Les patients présentent des insomnies associées à une désorganisation de l'architecture du sommeil. De plus, dans la journée les patients sont somnolents et ont du mal à rester éveillés ; ce qui se traduit par un temps excessif diurne passé à dormir avec des endormissements irrésistibles. Les somnolences diurnes excessives sont très invalidantes car incompatibles avec la réalisation d'activités quotidiennes nécessitant de l'attention, comme la conduite automobile, et de ce fait, elles contribuent à fortement limiter l'autonomie des patients. Ces troubles ne sont pas du tout améliorés par les traitements disponibles et sont même souvent aggravés. La prise en charge de ce trouble est donc indispensable pour améliorer la qualité de vie des patients. L'origine de ces troubles du sommeil n'est pas du tout élucidée et plusieurs hypothèses ont été émises, parmi elles on s'intéressera à l'effet de la déplétion en dopamine qui pourrait altérer le fonctionnement des centres d'éveil qui ne seraient alors plus suffisamment activés pour maintenir efficacement un éveil diurne. La disparition des neurones au niveau des centres de l'éveil chez le patient narcoleptique constitue, d'ailleurs, une explication à la survenue d'une somnolence diurne excessive associée à des accès irrésistibles de sommeil qui caractérise cette maladie. Sur le plan expérimental, il a récemment été montré que les singes présentaient des troubles de sommeil s'apparentant à ceux rencontrés chez le patient. En effet, l'architecture de leur sommeil est complètement désorganisée, ils présentent des éveils fréquents pendant la nuit et un temps excessif passé à dormir pendant la journée qui correspond à des somnolences excessives diurnes. Le singe parkinsonien constitue donc un modèle pertinent pour mieux comprendre la physiopathologie de ces troubles du sommeil et pour évaluer l'efficacité d'un traitement sur ces troubles. Ainsi, nous avons pour objectif d'étudier l'activité des neurones des centres de l'éveil chez des singes parkinsoniens afin de mieux comprendre la physiopathologie de la somnolence excessive diurne. Cette première partie de l'étude nous permettra de déduire des paramètres de stimulation électrique pouvant s'appliquer sur ces structures afin de palier à l'altération de leur fonctionnement. Dans une 2ème partie, nous évaluerons l'effet thérapeutique de la stimulation électrique diurne de ces régions cérébrales. Ces études seront donc appréhendées à un niveau préclinique dans un modèle de parkinsonisme proche de la maladie humaine, il nous est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Cette étude (en 2 parties) nécessitera 14 animaux, au maximum, afin d'obtenir des résultats exploitables et transposables à l'homme : 6 pour la partie fondamentale qui visera à caractériser le dysfonctionnement des centres cérébraux impliqués dans le maintien de l'éveil et 8 autres pour la partie thérapeutique préclinique qui permettra d'évaluer les effets thérapeutiques de stimulation électrique chronique de ces centres. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque partie de l'étude, permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Ce projet préclinique vise à évaluer l'efficacité de la stimulation cérébrale profonde sur le trouble du sommeil du parkinsonien. Il nous permettra aussi de mieux comprendre la physiopathologie du sommeil et ainsi de proposer des thérapies pour des pathologies du sommeil.

6815. Les coccidioses représentent le premier fléau parasitaire de l'aviculture conduisant à d'importantes pertes économiques de plus de 3 milliards d'euros dans le monde et par an. Ces maladies infectieuses sont provoquées par la multiplication de parasites protozoaires du genre *Eimeria*. Une fois ingérés, ces parasites envahissent les cellules intestinales et se multiplient massivement avant d'être excrétés sous forme d'oocystes.

Les pertes de production observées dans les élevages avicoles sont principalement dues à une morbidité qui se traduit par une malabsorption, une faible croissance et une mauvaise efficacité alimentaire chez le poulet de chair.

La prophylaxie repose principalement sur l'administration d'anticoccidiens dans l'aliment des animaux pendant toute la durée de l'élevage. Cependant, l'apparition de résistances aux anticoccidiens souligne la nécessité de trouver des moyens de lutte alternatifs. Notre partenaire privé a montré que la présence de levures dans l'alimentation des poulets permettait d'améliorer les performances zootechniques. Nous souhaitons aujourd'hui déterminer si ces levures destinées à la consommation animale pourraient avoir un effet sur le développement des parasites du genre *Eimeria*.

Dans l'objectif d'évaluer l'effet de levures *Saccharomyces cerevisiae* sur le développement parasitaire, 3 lots sont constitués pour tester 2 souches de levures (nommées A et B) vis-à-vis d'une infection mixte à *Eimeria* (*E. necatrix* + *E. brunetti*) :

- Lot témoin : non traité par les levures et infecté par *E. necatrix* et *E. brunetti*
- Lot traité avec une souche de levures A et infecté par *E. necatrix* et *E. brunetti*
- Lot traité avec une souche de levures B et infecté par *E. necatrix* et *E. brunetti*

Ce protocole a été établi dans le respect de la règle des 3R :

Les parasites du genre *Eimeria* sont spécifiques d'espèces hôtes. Après multiplication dans les muqueuses intestinales, ils sont libérés dans les fientes des animaux. La mesure de l'excrétion parasitaire permet d'évaluer la multiplication des parasites. A l'heure actuelle, aucune alternative *in vitro* fiable ne permet d'évaluer des produits qui peuvent agir sur l'immunité des animaux.

De manière à limiter le nombre d'animaux, le nombre de lots a été réduit à minima. Chaque souche ne sera testée qu'à une seule dose. Cette dose a été préalablement définie par le partenaire privé lors d'expérimentations évaluant l'effet des levures sur la croissance des animaux. Ce projet nécessite l'utilisation de 55 poulets conventionnels.

L'objectif est de comparer l'excrétion parasitaire entre les lots. Les parasites se multiplient au niveau des cellules épithéliales intestinales. Une infection massive induit la destruction de la muqueuse. Pour avoir une corrélation entre le développement des parasites et leur excrétion dans les fientes, la muqueuse intestinale ne doit pas être trop infectée. Les parasites, aux doses utilisées n'induiront donc pas d'effets pathogènes. Des points limites ont été définis et serviront si nécessaire.

6816. 1) Objectifs scientifiques du projet : La dyskinésie ciliaire primitive (DCP) est une maladie génétique caractérisée par des infections respiratoires ORL et bronchiques débutant dès la naissance. Malgré les traitements conventionnels, cette maladie aboutit à la destruction progressive des poumons et à l'insuffisance respiratoire. La DCP est l'affection congénitale des voies respiratoires la plus fréquente après la mucoviscidose.

Le travail de recherche consiste à évaluer la tolérance et l'efficacité d'une thérapie génique sur un modèle de souris déficiente. En effet, il existe une souris qui est porteuse d'une mutation spontanée dans un gène de la DCP. Cette souris est susceptible de faire des infections respiratoires récidivantes qui sont essentiellement localisées au niveau des sinus. Elle a relativement peu d'infections bronchiques par rapport à l'homme. Les cils des cellules épithéliales respiratoires de ces souris sont immobiles. Il est donc possible d'observer l'effet d'une thérapie génique sur la motricité des cils et sur les infections.

Les souris recevront un traitement sous anesthésie générale et seront observées, selon le groupe, entre 48h et 2 semaines avant les prélèvements finaux pour visualiser les effets de ce traitement.

La recherche de douleur et/ou de difficulté respiratoire liée à la maladie sera faite et traitée au besoin.

2) Retombées attendues dans le domaine de la Dyskinésie Ciliaire : cette étude est un essai thérapeutique avec des nanovecteurs non-viraux sur un modèle de souris qui nous permettra d'évaluer la tolérance du traitement et son efficacité à corriger cette maladie ce qui ouvrirait des espoirs de traiter efficacement les malades. La durée attendue de cette étude est de 2 ans.

3) Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Nous avons démontré précédemment que cette méthode de thérapie génique est efficace *in vitro* sur les cellules. Nous devons maintenant démontrer que ce traitement est efficace et tolérable sur un organisme entier.

Il existe des souris mutantes et un chien qui sont atteints de la même maladie que l'homme. Nous avons choisi le modèle de souris qui présente le moins de signes de cette maladie génétique (en particulier, ce modèle ne souffre pas de gonflement de la tête ou hydrocéphalie).

Le nombre de souris a été réduit au maximum tout en permettant une interprétation statistique de nos résultats. Le nombre total de souris inclus dans le projet est 236

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

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent une classification des procédures expérimentales en classe de gravité modérée.

Mots clés : infection respiratoire, maladie génétique, thérapie génique, nanovecteur.

6817. Le muscle strié adulte a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches appelées cellules satellites. Ces précurseurs musculaires doivent développer des interactions spécifiques avec leur environnement pour assurer la réparation du muscle et le renouvellement de la réserve de cellules satellites tout au long de la vie. Il a été montré que les macrophages

sont indispensables à la régénération du muscle, en agissant à plusieurs niveaux, notamment en stimulant les cellules souches musculaires. Il s'agit donc d'un processus inflammatoire bénéfique.

Il a été montré par ailleurs que les sujets atteints de diabète et/ou obèses sont sujets à une inflammation généralisée qui est délétère dans d'autres organes que le muscle. De plus, ces sujets ont des difficultés à réparer leur muscle squelettique. Cependant les mécanismes qui sont responsables des problèmes de cicatrisation du muscle ne sont pas connus.

Le projet vise à analyser la contribution des macrophages au cours de la régénération musculaire chez le sujet obèse/diabétique, et d'en analyser la régulation au niveau moléculaire. Connaître le rôle de ces cellules de l'inflammation chez le sujet diabétique permettra l'établissement de nouvelles connaissances scientifiques qui pourraient être utilisées pour cibler les actions spécifiques de ces cellules et améliorer la régénération musculaire dans ce contexte.

Le projet prévoit d'induire l'obésité/diabète chez des souris puis d'induire une lésion musculaire afin de mimer ce qui est observé chez l'homme en cas de blessure musculaire du sujet obèse/diabétique. L'utilisation de souris est indispensable car on ne sait pas mimer l'obésité/le diabète *in vitro*.

Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum, grâce aux analyses statistiques passées et disponibles dans l'équipe. Les tissus musculaires des animaux sont conservés dans une banque biologique constituée dans le laboratoire, ce qui permet de réutiliser les tissus pour des analyses ultérieures en fonction de l'avancement des connaissances sans recours à des animaux supplémentaires. Des expériences de culture cellulaire permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ce projet est prévu pour une durée de 5 ans et mobilisera un total de 844 souris.

- Réduction de la douleur, souffrance : des anesthésiques et analgésiques sont utilisés pendant et au décours des expérimentations afin de réduire la douleur et le stress des animaux. Les animaux sont, outre l'observation quotidienne, particulièrement observés au décours des expérimentations, notamment pendant les heures qui suivent le(s) traitement(s). Les points limite, clairement établis, seront strictement observés.

Des procédures de raffinement des protocoles sont observées afin d'enrichir l'environnement des animaux dans les conditions de mise en place du diabète.

6818. Ce projet de recherche consiste à caractériser et cibler les hémopathies myéloïdes en prenant en compte le concept de cellules souches cancéreuses et leur environnement. Ces cellules sont responsables de la production des cellules cancéreuses et des rechutes. La définition de la cellule souche normale ou maligne est fonctionnelle et nécessite la démonstration, par transplantations successives chez l'animal, de la capacité d'une cellule donnée à produire des cellules cancéreuses et de se renouveler.

Pour aborder cette problématique, nous utiliserons à la fois un modèle de souris transgénique et un modèle de souris humanisée (*NOD-SCID gamma c-/-*). Le modèle de souris humanisée, développé dans les années 2000, est largement utilisé pour aborder l'étude de l'hématopoïèse humaine et de la cellule souche, dont l'existence est confirmée par sa capacité à se greffer et se multiplier chez l'animal. Il présente la possibilité d'aborder *in vivo* des questions de biologie humaine. Cet aspect est pertinent car ce modèle s'inscrit dans une perspective visant à construire des modèles précliniques pour l'élimination des cellules souches cancéreuses. Dans le cadre de la règle des 3R, nous commençons ces études par des tests *in vitro* permettant une première validation des acteurs moléculaires ; les modèles d'étude *in vivo* ne sont utilisés que comme étape finale de validation. Par ailleurs, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (12 souris par condition d'analyse), nous utilisons des marqueurs sensibles et réalisons un suivi du développement de la maladie par des techniques d'imagerie *in vivo*, permettant de réaliser une analyse cinétique des mêmes animaux sur une période de plusieurs mois sans les sacrifier. Un total de 1600 souris sera utilisé pour la totalité de ce projet.

Une attention toute particulière sera portée au bien-être des animaux. Nous réaliserons un suivi quotidien des animaux. Les souris en expérimentation présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique (perte de poids, poils hirsutes, dos voûté, agressivité) seront euthanasiées selon la méthode réglementaire.

Nous espérons contribuer par ce projet à la caractérisation des cellules souches et pouvoir apporter ainsi de nouveaux outils de diagnostic et de dépistage des rechutes. La caractérisation des cellules souches malignes des pathologies myéloïdes chroniques permettra aux patients atteints de ces maladies de pouvoir bénéficier des avancées diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques.

6819. Les cancers du sein sont la première cause des décès liés au cancer dans le monde occidental chez la femme. Ces cellules tumorales possèdent un fort potentiel à migrer et à métastaser. Ce potentiel est fortement influencé par leur environnement, qui est composé de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) et de cellules du sein, appelées fibroblastes. Au cours du développement de la tumeur, l'environnement est fortement modifié par ces fibroblastes alors sous l'influence de la tumeur elle-même. Le but général du projet est d'étudier comment ce nouvel environnement favorise l'invasion du cancer. Par des expériences en trois dimensions (3D) *in vitro*, nous avons montré que ce nouvel environnement entraîne un changement important du métabolisme des cellules tumorales. De plus, nos résultats obtenus *in vitro* démontrent que l'utilisation d'inhibiteurs du remodelage matriciel bloque cette reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses et qu'à l'inverse l'ajout d'un inhibiteur de la reprogrammation métabolique bloque l'invasion des cellules tumorales. Dans ce contexte, nous nous proposons d'étudier le rôle de ce remodelage dans la reprogrammation métabolique des cellules tumorales *in vivo*. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'implantation de cellules tumorales murines dans la glande mammaire par injection sous anesthésie générale chez la souris femelle *BALB/c* âgées d'au moins 8 semaines. Pour les besoins de l'étude, 5 lots de 24 souris seront implantés avec des cellules tumorales non invasive (*67NR* ; lot 1) ou avec des cellules tumorales invasives qui sont métastatiques à long terme (*4T1* ; lot 2 - 5) en condition contrôle (lot 2 ; véhicule dans l'eau de boisson) et en présence d'inhibiteur du remodelage matriciel (lot 3 ; BAPN dans l'eau de boisson, 30mg/kg/jour et lot 4 ; Verteporfine IP 100µL à 50mg/kg/jour) ou de l'activité métabolique (lot 5 ; C968, IP 100µL à 10mg/kg/jour). Cette étude

permettra de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques anti-métastatiques potentielles pour le traitement de patientes atteintes de carcinomes à fort pouvoir métastasant.

Le nombre total d'animaux utilisés au cours de ce protocole a été évalué à 120 grâce à la méthode dite de Monte Carlo et calculé pour avoir un nombre nécessaire et suffisant pour les analyses statistiques adéquates.

Le suivi des animaux sera quotidien avec palpation et mesure de la taille des tumeurs et sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller l'état des animaux avec une évaluation objective des points limites. Les souris seront sacrifiées à 29 jours après implantation ou lorsque le point limite sera atteint. Ce point limite est défini par un volume tumoral de 1.5cm<sup>3</sup> atteint ou une ulcération de la tumeur. Seules des micro-métastases pulmonaires par les cellules 4T1 sont possibles environ 21 jours après implantation ; aucun phénotype respiratoire n'est néanmoins attendu jusqu'à 29 jours. En cas de douleur constaté chez les animaux, un antidouleur sera administré dans l'eau de boisson comme défini dans la fiche de score.

Ce protocole permettra d'élucider le rôle potentiel anti-métastatique des inhibiteurs du remodelage matriciel et de l'activité métabolique au cours de la carcinogenèse mammaire.

6820. La mise en place de l'asymétrie Droite/Gauche (D/G) qui contrôle le positionnement de différents organes (e.g. le cœur sur le côté gauche) est un aspect fondamental du développement animal. L'importance de ce processus est illustrée par des pathologies sévères résultant de défauts du positionnement asymétrique des organes chez l'homme. En effet, les estimations indiquent qu'environ 1/5.000 à 1/10.000 personnes souffrent de défauts d'asymétrie D/G, entraînant nombre de défauts cardiaques congénitaux, la malrotation de l'intestin et l'avortement spontané.

Des études chez la mouche drosophile ont démontré une activité essentielle de la protéine Myosine-ID et de son antagoniste Myosine-IC dans la mise en place de l'asymétrie D/G. Afin de comprendre si ces protéines pourraient également contribuer à des pathologies humaines résultant de défauts de l'asymétrie D/G, il est tout d'abord nécessaire de procéder à l'étude de ces facteurs dans un organisme vertébré, plus proche de l'homme. Notre projet de recherche vise donc à étudier chez l'embryon de poisson zèbre l'effet de l'inactivation des deux paralogues de myoId (myoId & myoIg) et de myoIc (myoIca et myoIcb). Ce présent projet d'expérimentation décrit les approches qui seront mises en œuvre pour générer et identifier des animaux adultes qui seront utilisés comme reproducteurs pour créer des embryons dépourvus de la fonction de différents gènes myoI. L'effet de ces mutations sur l'asymétrie D/G embryonnaire sera ensuite déterminé au cours d'expériences qui - de par le stade du développement auxquelles elles seront effectuées - ne relèvent pas du domaine de l'expérimentation animale.

Le présent projet d'expérimentation décrit deux procédures qui seront mises en œuvre dans le cadre de cette étude : 1, La création de mutations dans les gènes myoId et myoIg par l'utilisation du système CRISPR/Cas9. 2, L'élevage d'animaux homozygotes mutants pour les gènes myoId, myoIg, myoIca et myoIcb. Nous prévoyons ici un nombre de 2600 animaux utilisés en nous basant sur des estimations chiffrées motivées dans la demande. Dans un souci de respect de la règle des 3R ce nombre maximal d'animaux sera par la suite réduit en fonction des résultats obtenus à différentes étapes du projet. Dans un souci de raffinement des procédures, nous utiliserons des critères d'arrêt précoces basés sur plusieurs paramètres d'évaluation du bien-être animal.

6821. Les étapes précoces de l'ontogénie du lignage lymphoïde humain, notamment les relations développementales et phylétiques qui s'établissent entre les précurseurs T/B/NK/ILC, restent mal connues. Leur étude est rendue difficile par la rareté du matériel biologique accessible et du fait de la régulation développementale très stricte du potentiel lymphoïde des cellules souches hématopoïétiques humaines. Afin de pallier ces inconvénients, nous avons développé un modèle d'étude de la lymphopoïèse fœtale humaine chez la souris *NSG*. Ce modèle permet de produire *in vivo* l'ensemble des populations précurseur des lignages lymphoïdes, granulo-macrophagique et dendritiques présents dans la moelle osseuse fœtale humaine (projet déjà déposé et validé par le comité d'éthique). Ces populations peuvent être étudiées d'une façon simultanée par un cocktail de 12 anticorps sélectionnés au laboratoire. Les populations de progéniteurs, générées à 3 semaines dans les moelles osseuses des souris transplantées, restent rares, sont en pleine phase de multiplication et possèdent donc une faible probabilité de prise de greffe dans une souris *NSG* adulte. Des transplantations secondaires sont envisageables dans des nouveau-nés *NSG* où la prise de greffe d'un petit nombre de cellules avec un faible potentiel prolifératif est possible.

Environ 110 animaux nouveaux nés seront utilisés par année : 3 lots de souris par expérience, correspondant à 3 portées différentes de 6 souriceaux en moyenne, le nombre d'animaux sera variable à chaque expérience selon le nombre de nouveau-nés. Chaque portée sera injectée avec des cellules différentes mais provenant du même échantillon source. L'expérience sera répétée 3 fois pour chaque population selon le nombre de nouveau-nés afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Enfin nous testerons le potentiel de 6 populations différentes au total, 6 populations de 18 souris chaque = 108 souris. Les populations à transplanter aux souris seront sélectionnées par culture *in vitro* afin de limiter au maximum l'utilisation des souris, qui restent cependant un outil incontournable pour démontrer le potentiel *in vivo* des cellules étudiées. Nous effectuerons un suivi clinique hebdomadaire des souris avec pesée, les animaux seront sacrifiés si une perte de poids supérieure ou égale à 15% est observée.

Notre objectif à moyen terme est de produire une cartographie moléculaire, développementale et fonctionnelle complète de l'ensemble des populations cellulaires que nous avons identifiées. Une telle cartographie sera d'une aide précieuse pour la classification et l'étude des mécanismes de transformation des cellules cibles des hémopathies malignes.

6822. La maladie de Parkinson (MP) correspond à une mort progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*, une structure cérébrale qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la motricité. De fait, les symptômes de la maladie sont principalement d'ordre moteur.

A ce jour, le médicament qui permet de gérer les perturbations motrices chez le patient est la L-DOPA. Malheureusement, son utilisation au long terme entraîne fréquemment des complications motrices importantes (ou dyskinésies induites par la L-DOPA). Ces dyskinésies se traduisent chez le patient par l'apparition de mouvements anormaux involontaires extrêmes invalidants. Le traitement des symptômes moteurs de la MP constitue donc un enjeu majeur et correspond à un effort de recherche substantiel visant à :

- (i) trouver des molécules d'efficacité thérapeutique comparable à la L-DOPA mais qui n'entraînent pas de dyskinésies et
- (ii) trouver une solution thérapeutique permettant de traiter les dyskinésies induites par la L-DOPA.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets pharmacologiques de candidats-médicament sur les symptômes moteurs de la MP. Dans ce projet, la MP sera modélisée chez le rat en induisant expérimentalement une lésion spécifique de la voie dopaminergique par administration intracérébrale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Ce modèle, bien connu et caractérisé dans la littérature scientifique, est associé à un déficit moteur facilement évaluable.

A partir de la 3<sup>e</sup> semaine après chirurgie, le nombre de rotations induites par l'amphétamine ou l'apomorphine sera évalué de façon à sélectionner les animaux ayant subi une lésion représentative d'un stade avancé de la maladie (avec une perte neuronale >85%).

Pour évaluer le potentiel thérapeutique des candidats-médicament sur les dyskinésies induites par la L-DOPA, les animaux lésés recevront un traitement chronique de L-DOPA pendant 3 semaines à partir de la 4<sup>e</sup> semaine post-chirurgie. Par la suite, les mouvements anormaux involontaires (dyskinésies) seront quantifiés. Les rats seront ensuite traités par les candidats-médicaments selon un protocole croisé (ou en cross-over) avec le produit à tester (3 doses différentes), un produit de référence positive (l'amantadine par exemple) ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation du produit testé. L'effet bénéfique (antidyskinétique) potentiel des composés testés sera ensuite évalué grâce à l'utilisation d'échelles comportementales spécifiques permettant de quantifier les dyskinésies obtenues chez les animaux.

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

Remplacement : le projet est réalisé sur le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur les déficits moteurs et/ou non-moteurs dans le cadre de la MP. 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. Pour ce projet, il est prévu d'utiliser un nombre maximum de 1800 animaux sur 5 ans.

Raffinement : ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses, il est réalisé par un personnel formé attentif à la recherche des points limites et au recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

6823. La maladie de Parkinson (MP) correspond à une mort progressive des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*, une structure cérébrale qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la motricité. De fait, les symptômes de la maladie sont principalement d'ordre moteur. Cependant, des troubles non moteurs importants peuvent également apparaître notamment en raison de l'implication de la substance noire *pars compacta* dans différents réseaux neuronaux. Ainsi, des perturbations du système de récompense, des troubles cognitifs, de l'anxiété ou encore un état dépressif peuvent survenir.

A ce jour, il n'existe pas de solution thérapeutique satisfaisante pour prendre en charge ces troubles non-moteurs.

Dans ce projet, la MP sera modélisée chez le rat en induisant une lésion spécifique de la voie dopaminergique par administration intracérébrale de 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Ce modèle bien connu et caractérisé dans la littérature scientifique est associé à un déficit moteur et comportemental (anxiété, dépression, cognition).

Environ 3 semaines après chirurgie, la coordination motrice des animaux sera évaluée afin d'évaluer la lésion réalisée. Les animaux seront ensuite répartis entre 5 groupes expérimentaux et traités avec la substance à tester (3 doses différentes), le produit de référence ou le placebo (véhicule). Des tests comportementaux spécifiques seront ensuite réalisés afin d'évaluer l'effet des candidats-médicaments sur le déficit cognitif, l'anxiété, la dépression ou encore le système de récompense des animaux parkinsoniens.

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

Remplacement : Le projet est réalisé sur le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur les déficits moteurs et/ou non-moteurs dans le cadre de la MP. 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. On estime à 20% le nombre d'animaux qui seront exclus de l'analyse in fine (en raison de mortalité précoce, lésion insuffisante, absence). Pour ce projet, il est prévu d'utiliser un nombre maximum de 2250 animaux sur 5 ans.

Raffinement : ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses, il est réalisé par un personnel formé attentif à la recherche des points limites et au recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

6824. Les Chevaux de loisir et de sport sont amenés à se blesser accidentellement, au cours de bagarres entre congénères ou à cause de clôtures barbelées, entre autres exemples. La cicatrisation des plaies cutanées est délicate chez cette espèce. Les plaies situées sur la partie basse des membres, dans des zones de pli ou des plaies d'une grande surface ne peuvent pas être suturées et doivent cicatriser à plat. On observe alors des complications, spécifiques aux équidés, avec des cicatrisations lentes, parfois pathologiques. Dans le but de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques pour ce problème, nous souhaitons essayer un traitement innovant en recourant aux cellules souches. Il n'est pas possible de reproduire la complexité d'une cicatrisation cutanée à plat, surtout si l'on veut tenir compte des difficultés liées à la localisation de la plaie, autrement qu'en faisant appel à un modèle animal équin. Nous ne souhaitons

pas, dans un premier temps, faire des essais sur des chevaux de propriétaires blessés amenés à la consultation, pour pouvoir réellement tester, objectivement l'effet de notre traitement. Huit chevaux seront utilisés pour tenter de démontrer l'effet significativement bénéfique de l'utilisation des cellules souches dans le traitement de petites plaies cutanées superficielles. C'est le nombre minimum nécessaire pour montrer l'effet de façon statistique. Les chevaux, pendant le temps de la cicatrisation seront soignés quotidiennement par du personnel formé à la manipulation, au soin, et à la détection des signes cliniques anormaux chez le cheval. Les essais seront menés par des chirurgiens vétérinaires spécialistes du domaine. L'ensemble des essais auront lieu dans une structure agréée, régulièrement contrôlée par le Ministère de l'Agriculture. Les chevaux seront hébergés dans des boxes abrités, paillés et ils seront sortis régulièrement. Toute manifestation douloureuse au cours de la cicatrisation sera systématiquement traitée au moyen d'antalgiques.

6825. Lorsqu'une perte de substance n'est pas suturable et qu'elle ne peut cicatriser spontanément (exemple de la reconstruction mammaire), la technique du lambeau est utilisée lors de chirurgie reconstructrice pour réparer ces pertes de substance. C'est une procédure complexe qui nécessite d'isoler un lambeau (graisse, muscle et ou de la peau relativement épais >5mm) et de le recoller dans la zone concernée tout en maintenant le réseau vasculaire du lambeau. Le risque d'occlusion est très fort lors de la première semaine post opératoire, ce qui peut engendrer des nécroses et la perte esthétique et fonctionnel du lambeau. En cas d'occlusion, les chances de guérison (revascularisation du rabat) sont directement proportionnelles à la rapidité de diagnostic et de traitement curatif chirurgical.

L'objectif du projet est valider une technique de suivi post-opératoire non invasive, qui n'utilise pas d'agent de contraste, en suivant l'oxygénation des tissus en surface et en profondeur. La mesure est non invasive et peut être effectuée en continu pendant plusieurs jours.

Ce projet va permettre de finaliser un prototype utilisable en clinique humaine, en le testant sur des lambeaux cutanés abdominaux enfouis chez le porc.

Ces études seront réalisées sur animaux vivants, car ce protocole de suivi post opératoire nécessite d'utiliser un animal vivant. Le porc a été retenu car la structure cutanée et la taille du lambeau abdominal de porc sont très proches de ceux rencontrés en clinique humaine. Aucune méthode alternative n'est disponible à l'heure actuelle pour ce type d'étude. Ces études vont nécessiter de travailler sur maximum 20 porcs, nombre maximal d'animaux envisagés sur plusieurs sessions étalées sur 5 ans. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des porcs, en limitant leur stress par un hébergement collectif et en les manipulant par du personnel spécialement formé à cette espèce.

6826. Les polyomavirus, ont longtemps été suspectés de provoquer des cancers chez l'Homme. Cependant, les études menées depuis une quarantaine d'années n'ont pas fourni de preuves convaincantes d'une association avec les cancers humains. En 2008, un nouveau membre de cette famille, le polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV), a été isolé dans un cancer de la peau: le carcinome à cellules de Merkel. A la suite de cette découverte, il a été montré que l'infection par ce virus est très répandue dans la population et que seule une faible proportion des infections évolue vers un cancer.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'impact des cellules immunitaires suppressives (MDSC) chez des souris avec un système immunitaire déficient et ayant reçu des cellules cancéreuses humaines. Pour cela, les souris recevront par injection sous cutanée les cellules humaines cancéreuses pré-cultivées ou non avec des cellules immunitaires.

Le projet nécessite trente souris. Un premier lot de six souris servira à définir la dose pour laquelle 50% des injections conduisent au développement d'une tumeur. Suite à la détermination de cette dose, trois expérimentations indépendantes seront réalisées avec deux lots de quatre souris recevant pour l'un des cellules tumorales seules (lot témoin) et pour l'autre des cellules tumorales ayant été cultivées avec des MDSC.

L'euthanasie des souris sera pratiquée six semaines après injection des cellules ou en cas de développement de tumeur d'un diamètre supérieur à 1 cm, ou d'au moins 2 tumeurs d'un diamètre de 0.7 cm, d'apparition d'ulcération ou de dégradation de l'état de santé (perte de poids supérieure à 20%, prostration).

Remplacement : Afin d'étudier l'impact des cellules immunitaires sur le développement de vaisseaux sanguins et l'environnement tumoral, le passage à un modèle *in vivo* est nécessaire.

Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, les souris recevront quatre injections sous cutanées en quatre points correspondant à une dose de cellules cancéreuses préalablement déterminée.

Raffinement : Les souris seront dans des cages enrichies avec des maisonnettes en plexiglas et du papier absorbant. Du fait du statut immunodéficient des souris, l'ensemble du matériel d'enrichissement sera stérilisé.

6827. Les myocardites, ou atteintes inflammatoires du muscle cardiaque, posent des difficultés de prise en charge en l'absence d'outil non invasif permettant d'affirmer le diagnostic et de préciser le caractère évolutif ou non des lésions myocardiques. Le risque d'évolution vers une insuffisance cardiaque sévère justifie la recherche de tels outils pour adapter le suivi et le traitement des patients. La Tomographie par Emission de Positons (TEP) au FDG (analogue du glucose) est difficile à mettre en œuvre en raison de l'accumulation du FDG dans les cellules cardiaques normales. La 18F-méthyl-choline (FCH) et la 18F-fluoro-thymidine (FLT), utilisées pour l'imagerie TEP des tumeurs cancéreuses, s'accumulent dans certaines cellules inflammatoires, et pas dans le myocarde normal. Le but du projet, mené sur le modèle murin de myocardite de référence, est d'obtenir les preuves de concept que ces 2 traceurs permettent de détecter *in vivo* les cellules inflammatoires à la phase aiguë de la maladie. La myocardite sera induite par injection sous cutanée de peptide dérivé de la myosine de souris (10 souris malades et 6 souris contrôles pour chacun des traceurs,



soit 32 souris au total). Les lésions myocardiques inflammatoires apparaissent 10 jours après immunisation, s'intensifient jusqu'à 21 jours entraînant une dysfonction cardiaque, puis cicatrisent en quelques semaines. Dans ce protocole, les animaux seront explorés par échocardiographie et imagerie TEP/TDM à 3 semaines post-immunisation puis mis à mort. Les cœurs seront prélevés pour analyses histologiques. Il est attendu chez les animaux malades une hypercaptation des traceurs au niveau du myocarde par rapport aux animaux contrôles, et une corrélation entre les hypersignaux TEP et la densité des cellules inflammatoires.

La FCH et FLT ont déjà été validées *in vitro* sur cellules et en histologie. Cette étude correspond à la phase d'évaluation *in vivo* chez l'animal nécessaire afin de sélectionner la méthode la plus pertinente pour les études chez les patients. Les effectifs de chaque groupe sont limités au minimum permettant de mettre en évidence un signal TEP/TDM significatif sur le plan statistique (32 souris au total). Le suivi de la fonction cardiaque par imagerie non invasive (échocardiographie) permet de limiter le nombre d'animaux. Enfin les animaux seront surveillés quotidiennement, recevront un traitement analgésique pour soulager la douleur, et des dispositions seront prises pour limiter les symptômes survenant à l'effort au cours de la phase d'insuffisance cardiaque.

6828. La destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans productrices d'insuline au cours du diabète de type I (DT1) est de type auto-immun. Ce sont donc les propres cellules immunes de l'individu qui détruisent les cellules bêta. Un des buts thérapeutiques concernant le DT1 est d'arrêter la destruction auto-immune des tissus, que ce soit chez les patients possédant encore des cellules bêta résiduelles, ou après transplantation. A ces fins, une molécule capable de diminuer la réaction auto-immune, d'une part, et les réactions de rejet après transplantation d'autre part, serait particulièrement efficace. La molécule de tolérance HLA-G a ce potentiel. HLA-G est une molécule de tolérance naturelle. Elle a été associée à la tolérance de transplants et aux maladies auto-immunes. HLA-G est connue pour protéger le fœtus de la destruction par le système immunitaire de sa mère.

HLA-G est particulièrement pertinente dans le contexte du DT1 car les cellules bêta des îlots de Langerhans font partie des rares tissus adultes à l'exprimer. Après avoir démontré le rôle de la molécule HLA-G sur les îlots non pathologiques et chez des patients atteints de DT1 *in vitro*, nous évaluerons *in vivo* son utilisation comme molécule thérapeutique pour contrer l'auto-immunité et donc ralentir le DT1, d'une part, et pour promouvoir une meilleure tolérance aux îlots de Langerhans après transplantation, d'autre part. Par ces expérimentations, nous espérons identifier un mécanisme naturel de défense des îlots contre l'auto-immunité, et apporter des preuves de concept précliniques de l'intérêt de la molécule HLA-G pour la thérapie du diabète de type I.

Ce projet de recherche utilisant des animaux a été conçu en tenant compte de la règle des 3R. Le nombre d'animaux utilisé dans notre étude (80 souris) est réduit au maximum grâce à l'utilisation au préalable d'expériences réalisées *in vitro* et à une estimation du nombre nécessaire par un statisticien.

Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux. Nous réaliserons en particulier un suivi quotidien des animaux. Les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique (perte de poids, poils hirsutes, dos voûté, agressivité) seront euthanasiés selon la méthode réglementaire.

6829. Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'évaluer les effets neurocomportementaux d'un candidat-médicament et consiste en une batterie d'observations comportementales (FOB=Functional Observational Battery) permettant d'évaluer l'aspect et le comportement général de l'animal, différents réflexes neurologiques ainsi que la température corporelle suite à l'administration du produit à tester. Ces observations sont répétées dans le temps (de quelques heures à plusieurs jours, période suffisante pour caractériser la cinétique d'effet du produit. Ces observations sont réalisées chez le primate lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 72 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

Un maximum de 60 primates sera utilisé pour ce projet.

Remplacement : Dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets neurocomportementaux. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le primate est une des espèces de non-rongeurs 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 avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Par ailleurs, les animaux peuvent être utilisés à plusieurs reprises pour tester différentes doses du candidat-médicament ou différentes molécules.

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 recours à des procédures peu invasives réalisées sous anesthésie
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

6830. Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique). A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, multiplié en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immuno-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies cancéreuses et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigé spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses, a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par César Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenus le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du « non-soi ».
- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à des cellules immortelles de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire *in vitro* des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'AcM synthétisé par son lymphocyte parental.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, « Remplacer » (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, « Réduire » (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), « Raffiner » (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 250 souris.

Le temps d'immunisation des souris sera de 11 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation. Contrairement au protocole classique d'immunisation, dans ce programme aucun prélèvement d'échantillon sanguin ne sera effectué, permettant également de réduire la détresse.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur socialisation.

6831. L'intestin des mammifères héberge de très nombreuses bactéries ( $10^{14}$ ). Elles sont majoritairement localisées dans le côlon, à raison de  $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries/g de contenu colique. Elles sont également présentes en quantités non négligeables dans l'intestin grêle, site majoritaire de l'absorption des acides aminés. Ces bactéries, qui sont dotées de protéases et de peptidases, pourraient ainsi intervenir de manière significative dans la digestion des protéines alimentaires ou endogènes présentes dans la lumière intestinale, en complétant l'action du pancréas exocrine. De plus, si des travaux suggèrent que les bactéries intestinales sont susceptibles de fournir des acides aminés (issus de la dégradation des protéines), notamment indispensables, à l'hôte, il a également été montré qu'elles utilisent une partie des acides aminés présents dans les contenus de la lumière intestinale pour leur propre métabolisme. Le bilan net des rôles respectifs de ces voies anaboliques et cataboliques microbiennes dans le métabolisme azoté de l'hôte n'est pas connu.

Dans les prochaines décennies les sources protéiques d'origine animale ne pourront plus couvrir les besoins de l'Homme, il s'avère donc nécessaire de comprendre l'impact du microbiote sur les protéines végétales (dans le cas présent le gluten) en le comparant à une protéine animale de référence (la caséine) et donc de vérifier leur digestibilité et leur métabolisme.

Dans ce contexte, l'objectif du projet est de déterminer le rôle du microbiote intestinal dans la digestion, l'absorption et l'utilisation postprandiale ultérieure de différentes protéines alimentaires (i.e., protéines animales (caséines) et protéines végétales (gluten)). Ces protéines ont été choisies en raison de leurs différences de digestibilité (la caséine étant plus digestible que le gluten) et de composition en acides aminés (le gluten étant déficient en lysine). De plus le gluten est impliqué dans certaines pathologies

humaines. L'incorporation des acides aminés provenant des protéines alimentaires dans les bactéries intestinales sera également étudiée.

Il n'existe pas de modèle *in vitro* ou de simulation informatique suffisamment élaboré pour étudier à la fois la digestion et le microbiote intestinal, de même que les interactions complexes entre ces différents éléments, le recours à l'animal est donc irremplaçable.

Pour ce faire, les rats (40 animaux) recevront ou non pendant plusieurs jours un cocktail d'antibiotiques dans leur eau de boisson, permettant de diminuer drastiquement la quantité de bactéries présentes dans l'intestin. Suite à cela, ils ingèreront un repas test contenant des caséines ou du gluten marqués. Ce marquage permet de suivre de façon spécifique le devenir digestif et métabolique des protéines alimentaires. Les protéines animales et végétales n'ayant ni la même digestibilité ni la même composition en acides aminés, le rôle du microbiote pourrait différer en fonction de la source protéique ingérée (animale ou végétale). Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum indispensable pour permettre l'analyse statistique des paramètres mesurés et nous allons veiller à nous limiter aux seules expériences considérées comme indispensables. Les conditions d'hébergement (cages en plexiglass conformes aux nouvelles normes) seront améliorées par enrichissement du milieu (tunnel) et les procédures stressantes pour les animaux seront limitées au maximum. Les animaux utilisés seront des rats *Wistar Rcc Han* spécialement élevés pour l'expérimentation animale.

6832. Ce projet a pour but d'évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires chez le primate non-humain vigile en utilisant la télémétrie. La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques chez l'animal vigile non contraint.

Au cours de chaque étude, les primates, une fois instrumentés de manière chirurgicale, sont traités avec le candidat-médicament testé à différentes doses ou avec un véhicule qui a servi à préparer la formulation de la molécule testée. Chaque animal reçoit tous les traitements ou une dose unique du traitement et un total de 84 animaux est prévu pour le projet.

Plusieurs administrations pourront être effectuées sur un même animal en respectant une durée minimale de 72 heures de récupération entre 2 administrations, ce qui permet de raffiner l'expérience.

D'autres évaluations pourront être réalisées en parallèle de l'enregistrement des paramètres cardio-vasculaires par télémétrie, tels que des observations et réalisations de tests neuro-comportementaux ou des évaluations pharmacocinétiques.

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le primate car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets neurocomportementaux.

Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le primate est une des espèces de non-rongeurs 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. D'autre part, les animaux peuvent être utilisés à plusieurs reprises pour tester différentes doses du candidat-médicament ou différentes molécules.

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 recours à des procédures peu invasives réalisées sous anesthésie
- la recherche des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

6833. Ce projet a pour but d'évaluer le potentiel analgésique d'un produit, qui correspond à sa capacité à protéger l'animal de l'effet d'un composé irritant, l'acide acétique. Pour chaque étude, après un délai précisé dans le plan d'étude, les animaux recevront une injection intrapéritonéale d'acide acétique qui va provoquer des contractions abdominales. Cinq minutes après l'injection, le nombre de contractions abdominales est comptabilisé pendant une période de 25 min. Un produit analgésique va réduire le nombre de contractions observées pendant ces 25 min de test.

Au cours de chaque étude, les rats (en général 10 par groupe) seront traités avec le produit à tester à 3 doses différentes, et un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation du produit testé (total de 5 groupes par étude).

Remplacement : dans le cadre du développement de certains 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 analgésiques. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. 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. Au maximum 1500 animaux sera utilisé sur 5 ans.

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 recours à des procédures peu invasives réalisées sous anesthésie
- la recherche des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

6834. Le choc hémorragique est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. La cause d'hémorragie la plus fréquente et la plus grave est traumatique. Le choc hémorragique touche des sujets jeunes, victimes d'accidents ou d'agressions. Malgré les avancées de la réanimation, l'hémorragie reste à l'origine de 40% des décès des traumatisés graves. C'est la principale cause de décès évitable chez le traumatisé.

Pour maintenir en vie les patients en attendant le contrôle chirurgical ou radiologique (radiologie interventionnelle) du saignement, la prise en charge du choc hémorragique vise à conserver une perfusion satisfaisante des organes vitaux. Pour cela, l'hypovolémie liée à l'hémorragie est corrigée par du remplissage vasculaire (soluté cristalloïde principalement), administré dès le début de la prise en charge en ciblant des objectifs hémodynamiques simples exprimés en niveau de pression artérielle (80 à 90mmHg de pression artérielle systolique). Cette phase vise un compromis entre maintenir un apport minimum en oxygène aux organes vitaux et éviter une majoration du saignement au niveau des brèches vasculaires par une augmentation trop importante de la pression artérielle. Les objectifs définis dans les recommandations européennes sont exprimés en objectif de pression artérielle systolique (PAS) ou en objectif de pression artérielle moyenne (PAM). Cependant, l'administration de remplissage vasculaire n'est pas standardisée. Il est recommandé d'en perfuser le minimum nécessaire pour éviter de diluer les facteurs de coagulation et ne pas dépasser les objectifs de pression artérielle fixés, ce qui est relativement fréquent compte tenu de l'inertie de la réponse hémodynamique au remplissage vasculaire. La stratégie de réanimation comprend également l'administration de catécholamines vasoconstrictrices pour corriger la défaillance hémodynamique et limiter le remplissage vasculaire. Ces drogues sont complexes à manipuler. Un dispositif de traitement automatisé du choc hémorragique permet d'administrer la noradrénaline en association avec le remplissage vasculaire. Ce système a montré, sur l'animal, qu'il permet d'optimiser la prise en charge hémodynamique en apportant la quantité de noradrénaline nécessaire tout en évitant les sous et surdosages (qui entraînent une pression artérielle insuffisante ou excessive respectivement). Nous souhaitons dès lors profiter de ce système pour comparer les effets, sur les fonctions physiologiques, de différents traitements lors d'un choc hémorragique. Cependant, il faut, auparavant, calibrer ce système pour chaque nouveau traitement. Le premier traitement pour lequel nous souhaitons une administration automatisée lors d'un choc hémorragique est la vasopressine. La vasopressine est un puissant vasoconstricteur et présente une alternative pharmacologique aux amines vasoactives telles que la noradrénaline.

L'objectif de cette étude est donc d'adapter à la vasopressine les algorithmes établis pour l'administration automatisée de la noradrénaline et du remplissage vasculaire, dans un modèle de choc hémorragique contrôlé (c'est-à-dire une spoliation sanguine) chez le rat.

La complexité des régulations de la pression artérielle ne nous permet pas de nous affranchir des expérimentations sur l'animal. La première phase de développement du dispositif a cependant été réalisée *in vitro*.

30 rats *Wistar* maximum, répartis en 3 groupes, seront nécessaires à la réalisation de ce projet.

Le recours à l'analgésie et à l'anesthésie sera systématique pour limiter au maximum l'inconfort de l'animal.

6835. Le choc hémorragique est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. La cause d'hémorragie la plus fréquente et la plus grave est traumatique. Malgré les avancées de la réanimation, l'hémorragie reste à l'origine de 40% des décès des traumatisés graves. C'est la principale cause de décès évitable chez le traumatisé. La prise en charge initiale du choc hémorragique repose sur le maintien d'une perfusion tissulaire satisfaisante par le remplissage vasculaire (transfusion d'un liquide physiologique potentiellement associé à des agents vasopresseurs) et la transfusion sanguine dans l'attente du traitement définitif de la lésion hémorragique (par chirurgie ou radiologie interventionnelle). Ainsi, un équilibre entre le maintien d'une pression artérielle optimale pour l'oxygénation tissulaire et une aggravation du saignement lié à une pression artérielle excessive doit être trouvé jusqu'au contrôle de l'hémorragie.

Au cours de l'hémorragie, l'hypovolémie (diminution de la masse sanguine) est à l'origine d'une hypoperfusion (diminution de l'apport sanguin à un organe ou à un territoire) rénale, dont la principale conséquence est l'altération de la fonction rénale avec une diminution du débit de filtration glomérulaire. Lorsqu'elle est prolongée, l'hypoperfusion rénale aboutit à une destruction des tubules rénaux. Dans ce dernier cas, l'insuffisance rénale aiguë (diminution aiguë du débit de filtration glomérulaire) est sévère et prolongée. La survenue d'une insuffisance rénale aiguë au cours d'une hospitalisation en réanimation est un facteur de risque indépendant de mortalité hospitalière et expose au risque d'insuffisance rénale chronique (altération définitive de la fonction rénale).

La vasopressine et la noradrénaline sont deux vasopresseurs utilisés pour stabiliser la pression artérielle lorsque le remplissage vasculaire est insuffisant au cours du choc hémorragique. Toutefois, leurs effets respectifs sur la perfusion rénale ne sont pas rapportés au cours du choc hémorragique.

Le suivi de la perfusion rénale est rendu possible par l'utilisation de l'échographie de contraste. Cette technique, encore très peu utilisée sur le petit animal, permet de visualiser la vascularisation du rein et de quantifier sa perfusion microcirculatoire.

L'objectif de ce projet est double :

- comparer l'effet de la vasopressine et de la noradrénaline sur la perfusion rénale au cours d'un choc hémorragique contrôlé (une spoliation sanguine est réalisée via un cathéter placé dans un gros vaisseau).
- valider l'utilisation de l'échographie de contraste pour suivre la perfusion rénale chez le rat.

La complexité des mécanismes de régulation de la pression artérielle ne nous permet pas de nous affranchir des expérimentations sur l'animal.

Pour valider une différence de perfusion rénale de 25% entre deux groupes de rats avec une puissance de test de 80%, il faut au minimum 9 rats par groupe. Nous comptons une marge de 6 rats supplémentaires par groupe pour pallier les décès liés au choc hémorragique et les exclusions, mais dès que 9 animaux seront analysables par groupe, nous n'incluons plus d'animaux dans ce

groupe. Soixante rats, répartis en 4 groupes (contrôle, remplissage seul, remplissage associé à la vasopressine ou à la noradrénaline), seront nécessaires pour réaliser ce projet.

La perfusion rénale sera mesurée par échographie de contraste tout au long de l'expérimentation. Les autres paramètres mesurés viseront à évaluer la fonction rénale (débit de filtration glomérulaire) et suivre l'hémodynamique systémique du rat (débit cardiaque notamment).

L'ensemble de la procédure expérimentale sera réalisé sous anesthésie gazeuse, par isoflurane, associée à un analgésique puissant, la buprénorphine, pour limiter au maximum l'inconfort de l'animal. La mise à mort sera réalisée par surdose d'anesthésie gazeuse.

6836. La xénothérapie est un domaine d'avenir qui englobe toutes les thérapies à partir de tissus animaux, dévitalisés ou vivants ou de molécules d'origine animale. Les connaissances actuelles dans ce domaine ne permettent pas d'envisager la production de tous ces produits par des méthodes "*in vitro*". La production de ces molécules, tissus et organes à visée thérapeutique humaine par des animaux vivants est donc une méthode qu'il est nécessaire de développer.

Un obstacle majeur à cette stratégie est le rejet par l'organisme humain de tout matériel issu d'un organisme animal. Le projet a donc pour objectif la production d'une lignée de lapins qui pourraient être utilisés dans ce domaine. La modification génétique consiste à supprimer le fonctionnement d'un des gènes responsables de la présence de certaines molécules à la surface de toutes les cellules d'un individu. Ces molécules sont à l'origine de l'identité de chaque individu, le "soi", qui diffère d'un individu à l'autre et donc qui exclut la possibilité de dons d'organes, de tissus, de cellules entre individus d'origine éloignée. Supprimer le fonctionnement de ce gène chez le lapin permettrait de supprimer la présence de ces molécules à la surface des cellules chez le lapin, de réduire les rejets et rendrait possible l'utilisation de ces lapins génétiquement modifiés pour fournir des produits utilisables dans les divers domaines de la xénothérapie.

La production de lapins génétiquement modifiés sera effectuée par la technique de « gene editing ». Cela consiste à injecter dans l'embryon unicellulaire de lapin une nucléase, enzyme qui cible une région choisie du génome et provoque l'introduction de mutations à l'origine de l'arrêt du fonctionnement du gène.

Le protocole comprend diverses étapes

- la saillie de lapines ayant reçu un traitement hormonal de superovulation,
- la récupération des embryons unicellulaires par euthanasie des lapines, et l'injection de l'enzyme de modification,
- leur transfert dans les voies génitales d'une lapine receveuse,
- l'élevage des petits après leur naissance, l'analyse de leur génotype et de leur phénotype,
- la reproduction des animaux de génotype intéressant pour obtenir au moins un lapin mâle chez lequel le fonctionnement du gène a été arrêté.

Le protocole prévoit d'utiliser au maximum 80 animaux adultes répartis sur les différentes étapes. Ce nombre a été estimé en considérant que la prolificité de nos animaux se situe dans la moyenne généralement observée dans les élevages et en considérant notre taux moyen de réussite pour les expérimentations engagées. Cependant, pour utiliser le moins d'animaux possible, le protocole expérimental a été fractionné en étapes. A chaque étape du protocole, un objectif est fixé. C'est uniquement lorsque l'objectif est atteint que l'étape suivante peut être engagée. Par exemple, un premier lot d'animaux est introduit dans la première étape expérimentale. L'analyse des résultats est faite dès que possible. En cas de succès, la première étape est considérée comme acquise, aucun nouvel animal n'est introduit dans cette étape. Des animaux sont introduits dans la deuxième étape et ainsi de suite. Un nombre maximal de tentatives est fixé pour chaque étape, nombre qui a été établi sur la base de notre savoir-faire, et au-delà duquel nous estimons que la répétition de l'expérimentation n'aurait aucun intérêt (une modification des méthodes est alors éventuellement envisagée).

Toutes les précautions sont prises pour utiliser les animaux dans des conditions telles que les souffrances éventuellement engendrées soient réduites au maximum :

- surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes de souffrance ou d'altération de la santé.
- demande d'intervention auprès des vétérinaires présents sur le centre (dans l'unité, au sein de l'unité élevage du centre) ou du vétérinaire sanitaire responsable du bâtiment. Les recommandations du vétérinaire sont alors suivies pour soigner l'animal ou supprimer la douleur.
- dans le cas de femelles en gestation, si la mise-bas n'a pas eu lieu à la date théorique, une détection de la gestation peut être faite (échographie, palpation). Une césarienne peut être pratiquée et les petits adoptés par une femelle de l'élevage au cas où la mère n'est pas capable d'allaiter ses petits.

Des précautions comportementales sont mises en place : les animaux sont isolés (1 animal par cage) après leur sevrage (7 semaines après la naissance environ). Les cages sont grillagées ce qui permet aux animaux d'avoir des contacts visuels. Chaque cage est agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace. Des enrichissements sont proposés aux animaux (balles type ping-pong). L'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) est contrôlé et maintenu stable au cours du temps.

Des points limites sont définis pour les étapes où cela semble nécessaire. L'expérimentation est arrêtée à chaque fois que les points limites sont atteints.

6837. Le traitement des cancers, au niveau de la tumeur primaire et des métastases constitue un enjeu de santé public majeur. Il est clairement établi que la progression des tumeurs solides primitives et la dissémination métastatique nécessitent la mise en place de nouveaux capillaires sanguins, selon un processus appelé angiogenèse. Ainsi, ces capillaires croissent grâce à la migration, la prolifération et l'organisation en tubes de cellules endothéliales, cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins. En

parallèle, la gaine extérieure du capillaire, appelée matrice extracellulaire, est consolidée afin de répondre aux forces du flux sanguin. Cette matrice extracellulaire est constituée de macromolécules protéiques, assemblées et maintenues par des enzymes de remodelage matriciel.

Le projet de recherche a pour objectif d'analyser la régulation de l'angiogenèse tumorale par une enzyme de remodelage matriciel, surexprimée dans de nombreux cancers chez l'homme, la Lysyl Oxidase like 2 (LOXL2). Les conséquences des variations d'expression de LOXL2 sur l'angiogenèse tumorale seront analysées chez la souris. Cette étude ne peut pas être menée uniquement *in vitro* puisque l'angiogenèse régule et est régulée par de multiples échanges fonctionnels entre cellules tumorales et cellules stromales (cellules endothéliales et fibroblastes associés au cancer, en particulier). Notre projet nécessite par conséquent le recours à un modèle animal, qui intègre plusieurs composantes cellulaires et extracellulaires.

Dans ce projet, deux procédures expérimentales seront mises en œuvre chez la souris. La première procédure expérimentale consiste en des expériences d'implants de matrice extracellulaire contenant soit de la protéine LOXL2 purifiée, soit des cellules endothéliales, soit des fibroblastes associés au cancer, soit des cellules tumorales, injectés en sous-cutané (deux implants latéraux par souris). Ces expériences seront effectuées et suivies sur 3 semaines. Il s'agit d'une procédure peu douloureuse appliquée à environ 200 souris pour la totalité de l'étude (50 souris par groupe, réparties en 5 expériences indépendantes, chacune impliquant 10 souris). Ce nombre d'animaux est justifié par la répartition des expériences en différents groupes d'expérimentation et d'analyse, comme précisé ci-après et correspond au nombre requis pour réaliser des tests statistiques comparant des animaux ayant des implants avec ou sans gain d'expression de la protéine LOXL2. Selon les résultats de cette procédure, en cas d'effet net de la variation d'expression de LOXL2 sur le nombre de capillaires formés, la seconde procédure expérimentale consistera en des expériences d'injections de suspension de cellules tumorales, ayant ou non un gain d'expression de LOXL2 (deux suspensions cellulaires latérales par souris). Ces expériences seront effectuées dans des conditions d'injection puis d'hébergement et suivi spécialement conçues afin de réduire à son minimum la douleur et le stress. Ces expériences seront suivies sur 2 à 5 semaines. Cette procédure sera appliquée à environ 50 souris, nombre requis pour réaliser des tests statistiques comparant des animaux ayant reçu des suspensions de cellules tumorales avec ou sans gain d'expression de la protéine LOXL2.

A l'issue de ces deux procédures, les animaux seront euthanasiés selon la méthode recommandée par les comités d'éthique en expérimentation animale. Les implants ou les masses cellulaires contenant les cellules tumorales seront prélevées. L'angiogenèse tumorale sera alors évaluée par analyse de la vascularisation, qualitativement par des marquages immunohistochimiques et quantitativement par dosage d'hémoglobine. Ce programme de recherche permettra d'établir si les variations d'expression de LOXL2 régulent l'angiogenèse tumorale de façon dépendante de l'origine cellulaire du site d'expression (stromale ou tumorale). Ces données sont nécessaires à une meilleure connaissance des paramètres d'agressivité d'une tumeur et de son potentiel métastatique.

6838. Chez l'homme, les maladies cardiovasculaires (MCV) sont directement liées à l'état des petites et grosses artères. La rigidité artérielle et l'augmentation du diamètre des artères supérieures sont des indicateurs de problèmes de santé potentiels, y compris la crise cardiaque, les complications rénales, la sclérose et les attaques cardiaques. L'âge et la pression systolique sont les facteurs les plus importants de l'augmentation de la VOP (Vitesse de l'Onde de Pouls). Pendant le processus de vieillissement, on observe une calcification médicamenteuse et une perte d'élasticité dans les artères. Parmi les différents paramètres cardiovasculaires, la mesure de la VOP est un index classique de la rigidité artérielle et un prédicteur de mortalité cardiovasculaire dans les cas hypertensifs. Cette mesure est utile pour étudier les effets du vieillissement, des maladies vasculaires, des agents de vasodilatation et vasoconstriction sur les artères.

Le projet consiste à évaluer les effets de différents candidats-médicaments sur différents paramètres cardio-vasculaires dont la VOP chez le rat anesthésié.

Règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement

Ce projet est réalisé sur le rat anesthésié car il n'existe pas de méthode de substitution (culture cellulaire en particulier) pour évaluer les effets d'un candidat-médicament sur la rigidité artérielle. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. Pour ce projet, il est prévu un nombre maximum de 800 animaux sur 5 ans.

Le raffinement est effectué par un suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

6839. Le Syndrome de Chudley McCullough (CMCS) est une maladie rare (1/1.000.000) qui se caractérise par une surdité sévère, précoce et complexe et des anomalies cérébrales structurelles comprenant, entre autres, une agénésie partielle du corps calleux (qui correspond à l'absence de formation du corps calleux lors du développement du fœtus), une dysplasie du cervelet (qui correspond à une anomalie du développement tissulaire du cervelet), ou encore une hétérotopie frontale de la substance grise (qui correspond à un désordre du développement des neurones du cortex).

Le pronostic des perturbations du SNC est encore confus du fait du faible nombre de patients recensés. Le CMCS semble être la conséquence de mutations du gène GPSM2 (G Protein Signaling Modulator 2), sans que l'on connaisse les bases moléculaires de cette pathologie. Si le CMCS est une maladie très rare, la surdité est, elle, le désordre sensoriel le plus retrouvé à la naissance chez l'homme (1-1.5/1000). De plus, étant donné l'allongement de notre espérance de vie, les problèmes d'audition et d'équilibre sont un problème de santé publique majeur. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés au CMCS, l'étude chez l'animal est indispensable. Nous souhaitons en particulier générer des animaux mutants pour le gène mPins, l'homologue murin de GPSM2.

Notre projet visera à élucider les bases moléculaires du CMCS, à la fois dans l'oreille interne et le système nerveux. Nous évaluerons également le rôle de mPins dans la fonction adulte du cerveau. Notre projet repose sur une approche intégrative nécessitant le fonctionnement du cerveau et de l'oreille dans son intégrité ce qui reste encore impossible à modéliser.

Pour créer des souris dont le gène mPins est inactivé dans un tissu spécifique, nous utilisons le système Cre-loxP. Dans ce système le génome de souris dites « Cre » a été modifié afin d'exprimer la recombinase « Cre ». Cette enzyme est capable d'exciser des fragments d'ADN situés entre deux séquences particulières d'ADN : les sites « loxP ». En croisant les souris « mPins-loxP » avec les souris « Cre » on obtiendra des souris chez lesquelles l'enzyme Cre excise le gène de l'ADN mPins. Afin de contrôler la délétion du gène mPins dans l'espace-temps on utilise un promoteur spécifique de la Cre recombinase.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou biologie moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « *in vitro* » sont donc effectuées en amont de l'utilisation des lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 et 6 trios de souris (1 mâle et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la génération de souris désirées. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 trios de souris seront hébergés en continu.

Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 153 animaux pour chaque lignée, soit 306 animaux au total.

Raffiner : Le système Cre-loxP permet de réduire les effets défavorables résultant de l'ablation d'un gène et ainsi minimiser les effets négatifs sur le bien-être animal et limiter les décès pouvant être associés aux animaux knock-out (KO). En effet, la génération d'un animal KO consiste à « supprimer » un gène dans l'ensemble de l'organisme de l'individu. L'impact de cette altération dès l'embryogenèse et sur la totalité des organes peut entraîner des anomalies sévères pouvant conduire à des décès prénataux ou postnataux. Avec le système Cre-lox, la mutation du gène étudié peut être dirigée à la fois dans l'espace, c'est-à-dire dans un organe ou une structure spécifique de l'organisme, et dans le temps, c'est à dire à un stade particulier du développement de l'individu.

6840. La microscopie *in vivo* permet de visualiser et de suivre des événements biologiques à l'échelle de la cellule sur animal vivant. L'analyse d'un tissu au centre d'un système de visualisation (chambre dorsale) implanté chez la souris apporte des informations qualitatives et quantitatives en 4D sur les modifications vasculaires et structurales ainsi que sur les interactions cellulaires. Ce principe d'imagerie *in vivo* haute résolution a donc trouvé des applications dans de multiples domaines et particulièrement en cancérologie.

Notre projet a pour objectif d'optimiser un nouveau modèle de chambre dorsale, pour la visualisation du développement tumoral *in vivo* chez la souris, à différentes échelles (macro et microscopie) et selon différentes modalités d'imagerie (photonique, IRM et échographie). Ce modèle, très bien toléré par l'animal, a d'ores et déjà été validé en imagerie photonique pour le suivi de processus biologiques (sains ou pathologiques) sur plusieurs semaines. La validation en imagerie IRM n'en est qu'à ces prémices et les séquences d'acquisition doivent être précisément définies afin de caractériser la perfusion et la perméabilité vasculaire, paramètres qui viendront en complément des indices issus des images optiques et échographiques.

L'utilisation de l'imagerie pour la caractérisation d'un modèle tumoral présente des avantages majeurs : 1- le nombre d'animaux inclus est réduit puisque chaque animal sera suivi tout au long du protocole soit aucun sacrifice à chaque temps de mesure ; 2- aucune souffrance ne sera infligée à l'animal pour les acquisitions ; 3- chaque animal sera son propre contrôle et les données de suivi seront d'autant plus pertinentes. De plus, l'emploi d'un dispositif compatible pour différents types d'imagerie permettra également de corrélérer tous les indices recueillis en optique, IRM et échographie pour mieux caractériser le développement tumoral et ainsi trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cette étude se fera chez la souris *Nude* : le développement tumoral résultant d'une cascade d'événements moléculaires et d'interactions cellulaires, il n'est pas possible de reproduire simultanément l'intégralité de ces phénomènes sur cultures cellulaires ou organoïdes. Il n'est pas possible également d'élaborer des fantômes de réseaux vasculaires identiques (en termes de taille et de tortuosité) à celui d'une tumeur *in vivo*. Il est donc primordial que le protocole soit conduit sur un modèle présentant les mêmes caractéristiques biologiques que les tumeurs *in vivo*. Ainsi, l'utilisation de modèles animaux est incontournable.

Les animaux seront répartis en 3 lots de 10 souris interprétables suivant le type d'acquisition souhaitée (anatomique et/ou fonctionnelle). Le nombre total d'animaux inclus pour ce projet est donc de 36 souris (30+20% marge) sur les 5 ans du projet. Une marge de 20% (valeur moyenne établie sur des protocoles précédents) est appliquée pour tenir compte de la mortalité en chirurgie, des variabilités de prise de greffe et des réactions inflammatoires dans la fenêtre de visualisation empêchant toute acquisition en imagerie.

Suite à l'implantation de la chambre et l'injection de cellules cancéreuses, la croissance tumorale et les modifications de son microenvironnement seront suivies en imagerie IRM pendant une durée limitée par la croissance tumorale uniquement (en moyenne 35 jours pour le modèle tumoral envisagé). L'imagerie IRM des animaux se fera sous anesthésie générale, deux fois par semaine afin de caractériser les modifications anatomiques et fonctionnelles de la tumeur tout en respectant un temps de récupération suffisant entre deux séances d'imagerie. De plus, de l'enrichissement type cocoon sera ajouté dans la cage et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress. Les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés au minimum une fois/semaine.

6841. L'insuffisance cardiaque (IC) constitue une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays occidentaux. Dans cette maladie, la diminution du débit cardiaque est compensée par une production accrue d'adrénaline et de noradrénaline qui augmentent l'activité cardiaque en agissant sur les récepteurs bêta-adrénergiques. Mais cet effet, s'il est maintenu, devient délétère pour le cœur. En empêchant la fixation d'adrénaline et de noradrénaline, les bêta-bloquants protègent le cœur des effets néfastes de l'activité prolongée de ces hormones et constituent des médicaments importants pour le traitement de l'IC. Toutefois, les bêta-bloquants ont

également des effets secondaires qui limitent leur utilisation. Dans l'optique de trouver de meilleurs médicaments, il est important de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les récepteurs bêta-adrénergiques régulent la fonction du cœur. Il est bien connu que ceux-ci agissent par l'intermédiaire d'une protéine kinase particulière, appelée PKA, et que dans le cœur il existe deux formes de cette enzyme, la PKA de type I et PKA de type II. A l'heure actuelle, on connaît très mal la fonction respective de ces deux formes. Dans ce contexte, ce projet a pour but de comprendre le rôle de la PKA de type I. Etant donné qu'il n'existe pas d'inhibiteurs sélectifs de ces deux formes, l'utilisation de souris génétiquement modifiées est indispensable pour atteindre l'objectif.

Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (remplacement, réduction, raffinement). Le recours à des animaux se justifie par la nécessité d'étudier la fonction cardiovasculaire dans un contexte physiologique et physiopathologique. Il se justifie par l'impossibilité d'obtenir des lignées de cellules cardiaques adultes, par le fait que les cellules cardiaques ne conservent pas un phénotype stable et ne survivent pas au-delà de 48h de mise en culture primaire. Il se justifie également par l'impossibilité de simuler ex vivo la mise en place de l'insuffisance cardiaque qui est un processus complexe. Une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et pour avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Le nombre total de souris utilisées sera de 520.

Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress.

6842. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Ces antigènes contiennent plusieurs épitopes (déterminant antigénique) qui sont habituellement composés de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leurs spécificités, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque anticorps peut reconnaître un épitope. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

En l'absence de modèle non-animal pour l'obtention des anticorps pour les antigènes, les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer la règle des 3R à savoir le choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, l'optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole, l'amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile.

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants : 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps); 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps; 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps; et 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole (180) et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 540 Lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 56 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il soit apte à la fin de cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modérée. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.



Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

6843. Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Les immunogènes ont plusieurs épitopes (déterminant antigénique) dont chacun est composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque anticorps peut reconnaître un épitope. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, proliféré en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immuno-électromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a permis la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou ont des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM, se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par César Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenus le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris afin de permettre la production d'anticorps dirigés contre cette molécule, par leurs lymphocytes B.

- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate des souris immunisées, sont fusionnés à des cellules immortelles de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire *in vitro* des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix des animaux et de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petite taille et faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion. L'utilisation des animaux est nécessaire pour cette étape.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande de 250 souris pour 50 protocoles. Le temps d'immunisation des souris sera de 63 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il soit apte à la fin de cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation. Contrairement au protocole classique d'immunisation, dans ce programme aucun prélèvement d'échantillon sanguin ne sera effectué, permettant également de réduire la détresse.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

6844. Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif d'évaluer le potentiel toxique d'un candidat médicament ou vaccin pendant son développement préclinique. Conformément à la ligne directrice " ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals; EMA/CPMP/ICH/286/1995; December 2009", la réalisation de ce projet est indispensable pour chaque nouveau candidat médicament avant de démarrer les essais cliniques chez l'homme, et avant toute autorisation de mise sur le marché. L'évaluation de la toxicité d'un candidat médicament ne peut pas être réalisée *in vitro*. La réglementation internationale requiert l'utilisation en recherche biomédicale d'une espèce non -rongeur (tels que le rat et la souris). L'espèce est déterminée en fonction des études réglementaires prévues ou déjà réalisées dans une espèce donnée. Ce projet concerne une espèce non-rongeur, le lapin. Le lapin est l'espèce privilégiée pour les études de vaccins, car dans les études de doses répétées, cette espèce démontre une bonne immunogénicité. L'évaluation des effets se fait après 1 jour ou plusieurs semaines de traitements en fonction de la durée de traitement souhaitée/possible chez l'Homme. Ce projet consiste en

2 procédures qui englobent toutes les études nécessaires au développement préclinique d'un candidat médicament ou vaccin chez le lapin (études préliminaires, subchroniques et chroniques).

L'objectif étant de déterminer les effets potentiels du candidat médicament/vaccin, en l'administrant, par la même voie prévue chez l'homme, et selon le même schéma de traitement, chez le lapin.

Le nombre d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet varie selon le protocole expérimental et est déterminé *a minima* afin d'obtenir des résultats robustes et de respecter les lignes directrices en vigueur. Il est attendu d'utiliser au maximum 2475 lapins sur la durée du projet (5 ans). Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (pour la voie intra vitréenne par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Les animaux sont hébergés par paire pour les femelles et individuellement, avec enrichissement, pour les mâles et les femelles démontrant de l'agressivité en paire, car le lapin âgé de 3-4 mois a déjà un tempérament territorial et combatif avec ses congénères dans les conditions de vie en laboratoire. Les doses du produit sont choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive, néanmoins, des soins adéquats seront appliqués pour éviter l'inconfort. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (jouets, musique).

6845. Les traumatismes de moelle épinière sont caractérisés par une dégénérescence des neurones et la mise en place d'une cicatrice empêchant leur régénération. La barrière physique due à la cicatrice peut cependant être levée en insérant des ponts artificiels en matériau biocompatible au niveau du site lésionnel, tandis que la régénération axonale peut être déclenchée en stimulant électriquement les neurones. Afin de proposer de nouvelles prises en charges thérapeutiques aux patients tétraplégiques ou hémiparétiques, un consortium européen optimise une neuroprothèse implantable permettant de combiner et maximiser ces deux actions.

L'objectif du présent projet est d'étudier à un niveau cellulaire la réponse inflammatoire induite par les microfibrilles constitutives de la neuroprothèse et d'évaluer leur efficacité à promouvoir la régénération des axones lésés sur un modèle murin de traumatisme spinal. Il s'agit notamment de caractériser l'immunomodulation induite par la stimulation électrique pour mieux comprendre l'impact des différentes populations de cellules immunitaires recrutées à la lésion sur la dégénérescence axonale ou au contraire sur la protection et la plasticité neuronales.

Dans ce projet, le modèle reconnu d'hémisection dorsale unilatérale sera combiné avec l'implantation d'une fenêtre spinale, permettant de façon exclusive (seuls quelques rares laboratoires maîtrisent cette technique) la visualisation répétée des axones et des cellules immunitaires dans la moelle épinière d'un même animal pendant toute la phase de récupération post-traumatique. En effet des souris transgéniques triplement fluorescentes seront utilisées pour permettre la visualisation *in situ* par microscopie intravivante de l'évolution des populations d'axones et de cellules immunitaires d'intérêt identifiées sur la base de leur marquage fluorescent. Cette méthodologie unique permettra d'identifier le type de microfibrilles le plus inerte immunologiquement et les microfibrilles les plus facilitatrices de régénération axonale grâce à un suivi longitudinal des densités cellulaires pendant quelques semaines sur les mêmes animaux. Elle permettra également de vérifier en temps réel l'efficacité de la stimulation électrique sur la repousse axonale et la réponse neuroinflammatoire, puis de réajuster le protocole de stimulation pour optimiser le microenvironnement cellulaire lésionnel.

Ce projet est conforme aux exigences de la règle des 3R :

- Remplacement : ce projet est basé sur de nombreuses études *in vitro*, qui nous permettent de savoir précisément où chercher et quoi chercher. Cependant, à ce stade des recherches, l'utilisation de modèles complexes, i.e. d'animaux vivants, est requise avant d'envisager une application clinique.

- Réduction : la fenêtre spinale chirurgicalement implantée aux souris permet l'imagerie d'un même animal tout au long du protocole, ce qui réduit significativement le nombre d'animaux nécessaires, un même animal étant présent à tous les temps étudiés. De plus, seulement le nombre minimal de souris nécessaires à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif sera utilisé. Le projet nécessitera en tout la naissance de 2500 animaux parmi lesquels les 240 animaux triplement transgéniques seront soumis aux procédures expérimentales. Ces nombres seront réduits si des résultats extrêmement probants ou au contraire disqualifiants sont obtenus en cours de protocole expérimental.

- Raffinement : les seuls dommages escomptés dans ce projet sont les symptômes induits par l'hémisection dorsale, c'est-à-dire principalement des troubles somatosensoriels compte tenu de la localisation de la lésion. La lésion sera unilatérale plutôt que complète, comme classiquement pratiquée dans la littérature, de façon à minimiser l'impact fonctionnel inutile sur les animaux. Toutes les mesures possibles permettant d'améliorer les conditions de vie des animaux sont prises. Les animaux sont hébergés dans des cages respectant la surface minimale requise de 330cm<sup>2</sup>, avec un accès non-limité à la nourriture et l'eau, un cycle de 12h jour - 12h nuit, une aération, une humidité et une température de l'air contrôlées. L'environnement est enrichi de rouleaux en carton et de cotons pour que les animaux puissent se faire des nids. Les animaux sont visités et pesés tous les jours par des personnes compétentes dans le domaine de l'expérimentation animale. De l'agarose sucré à 4% est mise à disposition au fond de la cage pendant la procédure en guise d'enrichissement gustatif et stimulateur d'appétit. De plus, une anesthésie générale est mise en place avant toute expérimentation, chirurgie ou imagerie, afin de s'assurer de l'absence de stress ou douleur chez l'animal. Des agents anti-inflammatoires sont administrés quotidiennement aux animaux pendant les deux premières semaines suivant le traumatisme.

6846. Le syndrome de Brugada (SBr) est une maladie cardiaque rare (1/2000) caractérisée par un sus-décalage du segment ST sur les dérivations précordiales droites (V1-V2) de l'électrocardiogramme et un risque élevé de fibrillation ventriculaire et de mort subite. Cette maladie génétique affecte plus fréquemment les hommes (80% des cas). Les événements arythmiques surviennent généralement sur des sujets jeunes, avec un pic entre 35 et 40 ans. Récemment, une mutation (p.R211H) sur le gène RRAD, qui code la petite protéine G monomérique Rad (Ras associated with diabetes), a été identifiée par notre laboratoire chez six patients d'une même famille présentant un SBr. D'autres mutations de ce gène ont depuis été identifiées chez d'autres patients. Afin d'identifier les mécanismes physiopathologiques aboutissant aux anomalies électriques cardiaques en présence de la mutation p.R211H, nous avons généré un modèle de souris knock-in (souris KI) porteuse de la mutation équivalente, p.R210H. La mutation est localisée dans une zone du gène dont la séquence est parfaitement conservée entre l'homme et la souris. Notre objectif est de caractériser le phénotype cardiaque de ces souris. Cette étude fait suite à une étude *in vitro* réalisée avec des cardiomyocytes (cellules constituant le cœur) différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites des patients qui a permis d'identifier des anomalies de l'activité électrique cellulaire et ses mécanismes moléculaires. Cependant, les arythmies cardiaques sont des maladies complexes résultant des interactions entre les cardiomyocytes, dont l'activité électrique est altérée, les fibroblastes cardiaques (70% des cellules cardiaques) et le système nerveux autonome. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal. Cette étude sera réalisée en 3 étapes.

1. La première consistera à réaliser une étude électrocardiographique (ECG de surface 6 dérivations et échocardiographique sur 20 souris KI (10 mâles et 10 femelles) et 20 souris sauvages (10 mâles et 10 femelles). Les ECG seront enregistrés sous anesthésie sur les mêmes souris à l'âge de 9-11 semaines puis à l'âge de 29-31 semaines, en condition basale et après injection d'ajmaline (20 mg/kg, intrapéritonéale), un inhibiteur du canal sodique cardiaque utilisé en clinique pour le diagnostic du SBr. Cette étude permettra de déterminer si la mutation de Rrad entraîne des anomalies de l'ECG. Elle permettra également de vérifier si ces éventuelles anomalies sont plus marquées chez les mâles que chez les femelles, comme chez les patients.

Une semaine après le second ECG, une échocardiographie sera réalisée pour déterminer si la mutation de Rrad entraîne éventuellement des anomalies structurales et contractiles. Celle-ci sera réalisée sous anesthésie.

2. La seconde étape consistera à réaliser une exploration électrophysiologique, endocavitaire par cathétérisme cardiaque. Ces expérimentations seront réalisées sur 10 souris KI et 10 souris sauvages à l'âge de 9-11 semaines. Un second lot de 10 souris KI et un second lot de 10 souris sauvages seront explorées à l'âge de 29-31 semaines. En fonction des résultats obtenus lors de la première étape, ces lots seront composés soit de mâles, soit de femelles, selon le sexe présentant les défauts ECG les plus marqués. S'il n'existe pas de différence entre les sexes, les lots comprendront 5 mâles et 5 femelles. L'exploration endocavitaire, réalisée sous anesthésie et analgésie au site d'insertion veineuse du cathéter, en condition basale et après injection d'ajmaline, permettra de déclencher des arythmies par stimulation programmée, comme cela est réalisé chez les patients.

3. Enfin, si les deux étapes précédentes montrent que la mutation induit effectivement des anomalies ECG, nous enregistrerons l'ECG en continu sur des souris vigiles implantées avec un capteur télémétrique. Les capteurs seront implantés sur 10 souris KI et 10 souris sauvages à l'âge de 10 semaines. L'intervention chirurgicale sera réalisée sous anesthésie. Une analgésie péri-opératoire et post-opératoire sera mise en place. Les souris seront suivies jusqu'à l'âge de 30 semaines. La composition de ces lots sera basée, comme pour l'étape 2, sur les résultats obtenus lors de la première étape. L'ECG par télémétrie permettra de quantifier les défauts électrophysiologiques et l'incidence éventuelle d'arythmies ventriculaires spontanées (extrasystoles, tachycardie...) sans interaction avec un protocole d'anesthésie, d'une part, et, d'autre part, en fonction du rythme nyctéméral (pendant 24h). En effet, les arythmies associées au SBr sont plus fréquentes au repos et la nuit.

Respect de la règle des 3R.

Remplacement. Cette étude fait suite à une étude *in vitro* réalisée avec des cardiomyocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites des patients qui a permis d'identifier des anomalies de l'activité électrique cellulaire et ses mécanismes moléculaires. Cependant, les arythmies cardiaques sont des maladies complexes résultant des interactions entre les cardiomyocytes, dont l'activité électrique est altérée, les fibroblastes cardiaques (70% des cellules cardiaques) et le système nerveux autonome. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal.

Réduction. Il est envisagé d'utiliser 40 souris pour chacune des étapes 1 et 2. L'étape 3, si elle est réalisée, nécessitera 20 souris. Au total, un maximum de 100 souris sera donc nécessaire à la réalisation de cette étude. Au fur et à mesure de l'inclusion des données, des analyses statistiques seront réalisées. Si une différence statistiquement significative entre les souris sauvages et les souris Rrad+/R210H apparaît avant la fin des différentes expérimentations, celles-ci seront interrompues.

Si les examens électrocardiographiques (étape 1) et les explorations endocavitaires (étape 2) ne montrent pas de différences entre souris sauvages et souris KI, les expériences de télémétrie ne seront pas réalisées. Raffinement. Les souris seront hébergées en cages ventilées enrichies de tunnels pour s'abriter, ou de papier pour réaliser des nids. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque technique (voir plus haut).

6847. Chez l'animal comme chez l'Homme, le choc septique entraîne une activation importante de la réponse immunitaire susceptible de favoriser des surinfections et/ou le décès. Le rôle du système nerveux sympathique (SNS) dans la mise en place et le contrôle de cette réponse immunitaire est suspecté mais mal compris. L'objectif de l'étude est de préciser la contribution du SNS dans la réponse immunitaire induite secondairement à la mise en place d'un choc septique expérimental. Le rôle du SNS sera abordé par des études de suppression de fonction obtenue par sympathectomie chimique. Le choc septique sera induit par la procédure de ligature et ponction cœcale (CLP). L'effet de différents niveaux de sévérité du choc septique et l'effet du temps sur la mise en place de cette réponse immunitaire seront étudiés simultanément.

La sympathectomie sera obtenue par traitement des souris par 6-hydroxydopamine (6-OHDA) par voie intrapéritonéale la semaine précédant la chirurgie.

La procédure chirurgicale de CLP sera ensuite réalisée et 3 niveaux de sévérité seront évalués en parallèle. L'effet du temps sera évalué grâce à l'euthanasie des souris 24 heures, 48 heures et 72 heures après CLP.

La prise en charge de la douleur lors de la chirurgie sera réalisée grâce à une anesthésie générale et locale au niveau du site opératoire et grâce à un traitement analgésique mis en place avant l'induction de l'anesthésie et poursuivi pendant 2 jours après l'intervention. Lors de l'intervention les animaux seront placés sur un tapis chauffant afin de limiter au maximum l'hypothermie peropératoire. Un traitement antibiotique sera mis en place 6 heures après la chirurgie et maintenu pendant 2 jours. Enfin, une réanimation volémique sera également administrée aux souris à l'issue de la chirurgie. Ce modèle murin vise à se rapprocher au maximum de la prise en charge clinique réalisée chez l'Homme. Il est caractérisé par une très faible mortalité quel que soit le degré de sévérité initiale du fait de la prise en charge pharmacologique (antibiothérapie) mise en place à l'issue de la chirurgie.

Le calcul du nombre d'animaux par groupe a été réalisé grâce à un test statistique binaire de différence entre les groupes CLP sympathectomisé (SX-CLP) ou non (Sham SX-CLP) en prenant comme critère de jugement la survenue d'une lymphopénie splénique. En faisant l'hypothèse d'une fréquence de lymphopénie de 95% dans le groupe Sham SX-CLP (résultat attendu d'après nos données personnelles et la littérature) et de 50% dans le groupe SX-CLP, il est nécessaire d'inclure 16 souris par groupe afin d'assurer une puissance statistique de 90% et un risque alpha de 5%. Considérant l'ensemble des conditions présentées dans notre protocole, 384 souris maximum sont donc nécessaires à la réalisation de cette étude.

Le bien-être des souris à l'issue de la chirurgie sera favorisé grâce à leur placement sous lampe chauffante en présence d'aliments humides, de gel hydratant et d'une litière de cellulose dans la cage. Une surveillance des symptômes sera réalisée 2 fois par jour jusqu'à euthanasie des souris. Un point limite sera défini au-delà duquel les souris seront euthanasiées.

Dans chaque expérience, les résultats obtenus chez les souris septiques seront comparés avec ceux obtenus dans un groupe de souris contrôles non septiques chez des souris sympathectomisées ou non (4 groupes de souris). Le développement d'altérations immunitaires sera évalué par un panel de tests immunitaires réalisés *in vitro* en parallèle sur les organes prélevés après euthanasie. Un nombre minimum de souris de chaque groupe sera manipulé simultanément dans chaque expérience afin d'assurer la comparabilité des résultats. Les résultats obtenus dans cette étude nous permettront de démontrer le rôle du SNS dans la mise en place des altérations immunitaires induites par le choc septique avant d'envisager dans des études ultérieures les mécanismes sous-tendant ce rôle.

6848. Les agents transmissibles non-conventionnels (ATNC ou prions) sont responsables des encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST), dont la forme la plus connue est le variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) ou « maladie de la vache folle ». L'extrême résistance des prions aux procédés d'inactivation amènent les sociétés travaillant sur les procédés de sécurisation de l'instrumentation médicale à tester de nouveaux procédés physico-chimiques contre ces agents pathogènes. Cette extrême résistance et l'absence d'un test diagnostique font que le risque de santé publique attendant aux prions, notamment le risque de transmission interhumaine lié à l'usage d'instruments médicaux réutilisables, n'est que partiellement appréhendé. Sécuriser l'instrumentation médicale réutilisable au travers d'une décontamination efficace permettrait donc de mieux maîtriser ce risque.

De nouveaux procédés ont été dernièrement reconnus efficaces par les agences réglementaires, dont l'agence française (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé ANSM). Toutefois, la recherche et la mise sur le marché de produits tout aussi efficaces mais moins susceptibles d'abîmer les surfaces des instruments médicaux reste encore d'actualité. Un nouveau programme de recherche a été ainsi initié pour démontrer l'efficacité de nouveaux produits « doux », alcalins ou enzymatiques vis-à-vis des prions. Dans ce cadre et en accord avec le « protocole standard prions (PSP) » de l'ANSM, des expérimentations *in vitro* ont tout d'abord démontré l'efficacité des produits que l'on souhaite tester lors de cette étude *in vivo* vis-à-vis de 6 souches différentes de prions, dont la souche de référence, la souche de tremblante expérimentale adaptée au hamster, la souche 263K et une souche du variant de la Maladie de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ).

Le « protocole standard prions (PSP) » exige une confirmation de ces résultats biochimiques par un test d'infection d'une souche de rongeur. Cette phase expérimentale chez l'animal est indispensable et impossible à remplacer par une autre approche, même cellulaire, car les prions ne se répliquent en quantité que chez certaines espèces animales, comme les rongeurs. Cette approche augmente la sensibilité du test, donc garantira aux patients une meilleure biosécurité de l'instrumentation médicale qui sera traitée dans ces machines. :

Le nombre d'animaux a été ajusté en favorisant dans un premier temps les expérimentations *in vitro* et en réduisant le nombre d'animaux par groupe au minimum nécessaire pour conserver la puissance du test statistique. Cette phase expérimentale engagera 572 animaux nés et élevés dans un établissement reconnu. Des protocoles d'anesthésie préalablement définis et validés avec l'équipe vétérinaire, seront utilisés tout au long de ces expérimentations de 12 mois. Le bien-être des animaux sera amélioré par la mise en place d'un enrichissement de milieu. De même, l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant les signes caractéristiques d'infection et le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée au moindre signe de souffrance. Au terme des 12 mois post-inoculation, tous les animaux seront euthanasiés afin de rechercher la trace d'infection dans leur cerveau.

6849. La consommation de fruits et légumes est associée à une plus faible incidence de nombreuses pathologies (maladies cardiovasculaires, certains cancers, maladies neurodégénératives...). Cet effet bénéfique peut être expliqué par la présence de micronutriments (comme les polyphénols) dans ces aliments. Malheureusement les études d'intervention avec des micronutriments purifiés ont, la plupart du temps, donné des résultats décevants. L'explication la plus probable est que les micronutriments n'ont pas les mêmes effets lorsqu'ils sont consommés purifiés ou via leur matrice végétale. La matrice apporte non seulement les

micronutriments candidats aux effets bénéfiques pour la santé, mais aussi de nombreuses autres molécules qui peuvent, soit expliquer par elles-mêmes les effets bénéfiques observés, soit interagir avec les micronutriments candidats, soit présenter une combinaison des deux types d'effets. La matrice végétale pourrait aussi optimiser la cinétique de libération des micronutriments le long du tube digestif.

A cela, il faut ajouter la contribution du microbiote intestinal. En effet, ce dernier va métaboliser ces micronutriments et interagir avec la matrice végétale : il va moduler la quantité de ces micronutriments absorbée (biodisponibilité) ou des molécules obtenues par leur métabolisation.

Notre objectif sera dans un premier temps de définir la contribution du microbiote intestinal (ensemble des bactéries présentes dans l'intestin) à la biodisponibilité des polyphénols contenus dans la pomme grâce à l'utilisation de modèles animaux axéniques (dépourvus de microbiote). Dans un deuxième temps, nous évaluerons comment la matrice alimentaire "compote de pomme" peut influencer l'activité de biotransformation de ces polyphénols par le microbiote intestinal et comment elle peut ainsi moduler leur biodisponibilité intestinale. Nous chercherons enfin à caractériser la nature chimique des produits de biotransformation de ces micronutriments, leur transfert à l'hôte sous forme de métabolites circulants et les espèces bactériennes responsables de ces biotransformations.

Les mécanismes étudiés mettant en jeu des interactions complexes entre les micronutriments, la matrice végétale, l'hôte et ses bactéries, il est impossible de les reproduire dans un modèle *in vitro*.

Pour cette étude, nous allons utiliser 32 rats *Fisher* axéniques, provenant d'un élevage autorisé, qui seront répartis en 2 groupes, un groupe témoin dépourvu de microbiote et un groupe auquel nous inoculerons un microbiote humain. Ces deux lots de rats seront divisés en 2 autres lots, l'un recevra les polyphénols purifiés et l'autre lot recevra les polyphénols dans la matrice "compote". Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé que 32 rats (soit 8 rats par groupe) est le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Pour que tous les animaux reçoivent la même dose de polyphénols sous forme purifiée ou dans la matrice, les rats seront gavés 6 jours par semaine durant un mois. Ce gavage sera effectué par une personne compétente qui maîtrise parfaitement le geste. Les animaux seront pesés de façon hebdomadaire et des prélèvements de fèces et de sang (par simple piqure à la queue) seront réalisés en début et en fin d'expérience. Deux rats seront hébergés par cage pour éviter l'isolement et leur milieu de vie sera enrichi par ajout de sopalain. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

6850. Le but de ce projet est de tester l'efficacité d'une approche thérapeutique innovante dans le cadre de la glycogénose de type 1a. Cette maladie génétique rare entraîne des hypoglycémies sévères lors des jeûnes courts. Les patients atteints de glycogénose de type 1a sont incapables d'utiliser leur stock de glycogène (forme de stockage du glucose) pour produire du glucose en dehors des repas. La pathologie se traduit par une accumulation excessive de glycogène et de lipides dans le foie et les reins aboutissant à une augmentation de la masse de ces organes et une stéatose. De nombreuses complications apparaissent à long terme, en particulier le développement d'adénomes et carcinomes hépatiques et une insuffisance rénale. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour cette maladie et la transplantation hépatique et/ou rénale est la seule solution lorsque le développement tumoral est trop important ou en cas d'insuffisance rénale.

Pour l'étude de cette maladie, nous disposons de modèles de souris qui présentent toutes les caractéristiques de la pathologie hépatique ou rénale, grâce à une mutation du gène *G6pc* ciblée dans l'un des deux organes par utilisation d'une transgénèse tissu-spécifique (foie et rein, respectivement). Alors que les souris qui ont une mutation dans tous les tissus ne survivent pas au sevrage, ces modèles animaux sont viables. En effet, les souris qui développent une glycogénose hépatique ne peuvent pas utiliser leur glycogène hépatique et développent une hypoglycémie légère en situation postprandiale (6 heures de jeûne), une hépatomégalie et une stéatose. Cependant, elles sont capables de réguler leur glycémie au cours d'un jeûne plus long grâce à une induction de la production de glucose par les reins et l'intestin. De plus, elles ne présentent pas de phénotype dommageable à l'état nourri. Les souris avec une glycogénose rénale développent progressivement la pathologie rénale mais régulent très bien leur glycémie grâce à la production hépatique de glucose. Ces deux modèles représentent un outil original et utile pour étudier le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour cette maladie.

Dans ce projet, nous proposons de tester une nouvelle stratégie qui devrait permettre de rétablir la production de glucose par le foie et les reins grâce à une dégradation des stocks de glycogène en glucose libre. Grâce à l'utilisation d'un vecteur viral recombinant injecté chez la souris, nous ferons produire par le foie une enzyme de dégradation du glycogène, l'alpha-glucosidase acide, qui sera sécrétée dans la circulation sanguine. Ces virus ont déjà été utilisés en thérapie génique dans le cadre du traitement d'autres types de glycogénose. En agissant au niveau du foie et des reins, l'enzyme devrait être capable de dégrader le glycogène accumulé pour produire du glucose. L'efficacité du traitement sera évaluée par mesure des stocks de glycogène et triglycérides hépatiques ou rénaux et différents paramètres sanguins (triglycéridémie, cholestérol...) et urinaires.

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

Remplacement :

L'étude ne peut être réalisée que chez l'animal car l'efficacité de la thérapie est dépendante du taux de sécrétion de l'enzyme dans le sang et de son action ensuite sur la dégradation du glycogène *in vivo* dans le foie et les reins.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste pour valider cette preuve de concept. Deux lots de 6 souris atteintes de glycogénose hépatique et deux lots de 6 souris atteintes de glycogénose rénale seront traités par un AAV exprimant l'alpha-glucosidase spécifiquement dans le foie. En référence, deux lots de 6 souris atteintes de glycogénose hépatique et deux lots de 6 souris atteintes

de glycogénose rénale ne seront pas traitées. L'efficacité du traitement sera analysée 1 mois et 6 mois après l'injection. Au total 48 souris seront utilisées sur une période maximale de 12 mois.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux seront suivis quotidiennement et les procédures expérimentales seront réalisées en tenant compte de la sensibilité des animaux. La bonne connaissance du modèle a permis de définir des points limites. Pour limiter la douleur, un anesthésique sera appliqué sur la peau lors des ponctions de sang. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever le foie et les reins pour analyser le métabolisme par dosage de la quantité de glycogène et de lipides.

Ces expériences réalisées *in vivo* chez la souris permettront d'évaluer l'efficacité de la dégradation du glycogène dans le foie et les reins comme stratégie de traitement de la glycogénose de type 1a, en libérant du glucose libre.

6851. Le muscle strié adulte a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches. Ces cellules souches agissent avec leur environnement pour assurer la réparation du muscle tout au long de la vie. Il existe cependant des pathologies musculaires dégénératives (comme la myopathie de Duchenne) au cours desquelles le muscle ne régénère pas et se détériore progressivement, entraînant une mort précoce des patients. Ces pathologies sont dues à un défaut génétique qui induit une détérioration des fibres. Comme les cellules souches sont programmées pour réparer le muscle, la détérioration permanente du muscle enclenche un phénomène permanent de tentatives de régénération. Ceci induit de l'inflammation chronique et de la fibrose qui remplace progressivement le muscle. Ces deux processus ont été peu étudiés dans le muscle squelettique. Le projet vise à comprendre les rôles des cellules qui sont impliquées dans l'inflammation chronique et la fibrose dans ces pathologies dégénératives. Nos études utilisent de la culture cellulaire, à partir de cellules humaines, mais également de cellules murines. Ces expériences *in vitro* sont couplées à des expériences *in vivo*, nécessitant le recours aux animaux (souris). Si les interactions cellulaires peuvent être étudiées *in vitro*, il est indispensable de valider leur importance dans les modèles pathologiques *in vivo*. Un modèle animal reproduisant au plus proche la pathologie humaine est nécessaire pour les études précliniques.

Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum, grâce aux analyses statistiques passées disponibles dans l'équipe, sur la procédure utilisée. Les tissus musculaires des animaux sont conservés dans une banque biologique constituée dans le laboratoire ce qui permet de réutiliser les tissus pour des analyses ultérieures en fonction de l'avancement des connaissances sans recours à des animaux supplémentaires. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des expériences de culture cellulaire sont d'abord menées afin d'établir les faits biologiques, qui sont ensuite validés *in vivo*. Ce projet utilise 540 souris.

- Raffinement : Des microlésions sont réalisées dans un muscle de l'animal, sans conséquence clinique, et un anesthésique est utilisé pendant l'expérimentation afin de réduire le stress et la douleur des animaux. Les animaux sont, outre l'observation quotidienne, observés au décours des expérimentations. Les points limite, clairement établis, seront strictement observés.

- Les animaux sont hébergés dans des cages avec enrichissements adaptés.

6852. L'œil a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse contenue dans les photons en influx nerveux. Ces messages nerveux sont ensuite transmis jusqu'au cortex visuel et interprétés en images. La conversion de l'information lumineuse en information électrique est réalisée par le mécanisme de phototransduction. Ce mécanisme se déroule au niveau de la couche la plus interne de l'œil, la rétine, et plus particulièrement dans les photorécepteurs rétiniens. Il existe deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes. Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sont indispensables à la fonction et à la survie des photorécepteurs.

L'Amaurose congénitale de Leber (ACL) est caractérisée par une dégénérescence très précoce des photorécepteurs associés à une perte de la vision dans l'enfance. A ce jour, des mutations dans plus de 17 gènes ont été associées à des ACL chez l'homme. Parmi ces mutations, celles touchant le gène *Rpe65* représentent environ 2% des cas totaux d'ACL. *Rpe65* est une enzyme exprimée au niveau des cellules de l'EPR. Elle est nécessaire à la synthèse du photopigment des photorécepteurs. Un défaut de fonction de cette enzyme entraîne une perte importante de la vision nocturne puis diurne. Actuellement, il n'existe aucun traitement efficace pour traiter les ACL liées à un défaut en *Rpe65*. Cette pathologie étant autosomique récessive, la thérapie génique d'addition, qui consiste en l'apport d'une copie supplémentaire du gène *Rpe65* dans les rétines déficientes, est donc une approche thérapeutique intéressante. Nous avons évalué un vecteur adéno-associés pour le traitement par thérapie génique d'une forme d'Amaurose congénitale de Leber liée à une mutation dans le gène *Rpe65*. Nous travaillons chez le chien *Briard Rpe65<sup>-/-</sup>*, un modèle canin naturel d'Amaurose congénitale de Leber liée à une mutation dans le gène *Rpe65*. La dégénérescence rétinienne chez ce chien est très proche de celle observée chez l'homme, ce qui en fait un très bon modèle préclinique pour l'évaluation d'un traitement par thérapie génique des rétinites pigmentaires liées à une mutation dans le gène *Rpe65*. De plus, la taille et l'anatomie de l'œil du chien sont beaucoup plus proches de celles de l'homme que ne le sont celles des rongeurs. Il est ainsi possible d'injecter un volume de vecteur identique à celui qui sera injecté chez l'homme et de mieux évaluer la dose thérapeutique. Nous avons démontré que l'injection sous-rétinienne d'AAV2/5.h*rpe65* qui code pour le gène *rpe65* humain sous le contrôle du promoteur humain *rpe65*, spécifique de l'EPR, permettait de restaurer au long-terme la vision du chien *Rpe65<sup>-/-</sup>*. Ces résultats précliniques ont permis le démarrage d'un essai clinique de phase I-II chez 9 patients humains *Rpe65*-déficient en 2011. Les premiers résultats cliniques sont très encourageants, et de nouvelles méthodes de production et de purification du vecteur de grade clinique sont en cours pour améliorer encore l'efficacité du vecteur. Nous souhaitons maintenant tester l'efficacité de ces nouveaux vecteurs.

La toxicité de 5 vecteurs différents sera testée chez des rats (n=25).

Puis la fonctionnalité d'un lot de vecteur sera testée dans le modèle *Briard Rpe65/-* (n=10, 2 à 3 animaux par groupe). Ce nombre est le minimum requis pour permettre une interprétation fiable des résultats sachant qu'il existe une certaine variabilité individuelle après transfert de gènes dans la rétine. Il n'y aura pas d'analyse statistique.

Les animaux seront répartis de la façon suivante :

Rats :

6 lots, 5 vecteurs à tester et un lot témoin. N=4 animaux par lot et 5 animaux témoins (2 rats non injectés et 3 rats injectés avec de la solution oculaire injectable = véhicule)

Chiens :

Le but chez les chiens RPE65 est d'injecter les 2 yeux afin de comparer 2 procédés de production de l'AAV2/4, comparer l'AAV2/4 nouveau procédé avec un vecteur de référence, et enfin d'évaluer 2 doses différentes de l'AAV2/4 nouveau procédé.

10 chiens (8 homozygotes et 2 hétérozygotes) seront inclus dans 4 groupes :

Groupe contrôle : n=2, 2 yeux injectés tampon de formulation

Groupe #1 : n=2, œil G injecté tampon, œil D injecté avec l'AAV2/4 ancien procédé de production

Groupe #2 : n=3, œil G injecté AAV2/4 procédé de production optimisé, œil D injecté AAV de référence

Groupe #3 : n=3, 2 doses d'AAV2/4 optimisé dans chaque œil

Tous les examens cliniques et les injections sont réalisés avec sédation et anesthésie appropriée en présence d'un vétérinaire anesthésiste. Des protocoles seront mis en place et adaptés à l'espèce concernée et aux procédures expérimentales : anesthésie gazeuse seule (rat), anesthésie fixe au Nesdonal® avec relai gazeux et prémédication au Calmivet® (chien), anesthésie locale par instillation de gouttes oculaires. Afin d'éviter l'apparition de réactions inflammatoires un traitement post opératoire sera effectué.

L'état général et l'alimentation des animaux (chiens et rats) sont surveillés quotidiennement par les animaliers et le vétérinaire référent.

D'autre part les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur, avec un programme d'enrichissement du milieu pour les différentes espèces.

6853. L'actuelle pénurie d'organe, en vue de transplantation, en France et dans le monde conduit les médecins et les scientifiques à utiliser de nouveaux donneurs d'organes. En effet, depuis quelques années, nous assistons à un essor du prélèvement de reins dits « critères élargis ». Ces reins présentent une survie moindre, mais la vie du patient est améliorée par rapport à la dialyse. Ces organes issus de donneurs plus âgés ou présentant certaines comorbidités cardio-vasculaires présentent une fragilité plus importante, en particulier aux phénomènes d'ischémie/reperfusion. Parallèlement à l'apparition de ces donneurs « marginaux », de nouvelles techniques de conservation d'organe se développent et ces dernières années, des progrès ont été réalisés dans le développement de solutions de conservation des organes.

Une nouvelle solution de perfusion contenant du polyéthylène glycol (PEG), présente des résultats intéressants quant à une prolongation de la survie des greffons ayant été conservés dans cette solution, comparativement à des solutions plus classiques, dans différents modèles d'allotransplantation d'îlots pancréatiques chez la souris et d'allotransplantation rénale chez le porc.

La situation particulière d'allo-immunisation anti-donneur en transplantation rénale, est développée soit en amont de la transplantation chez des patients ayant déjà reçu une greffe, des femmes multipares ou des polytransfusés, soit en aval de la transplantation, prédispose à la survenue plus fréquente de rejets à médiation humorale, aigu et/ou chronique, avec un impact majeur sur la survie des greffons. La prise en charge thérapeutique de ces rejets est mal codifiée, imparfaite et ne s'adresse qu'à la réactivité humorale du receveur. Le facteur le plus efficace actuellement est la prévention de ces situations par l'identification d'incompatibilités à éviter, avec comme résultante un accès à la greffe bien plus limité dans cette population de patients dits immunisés voire « hyperimmunisés ». La conséquence est que ces patients restent parfois de longues années en liste d'attente, et certains d'entre eux meurent avant de se voir proposer un greffon.

Nous avons développé un modèle préclinique de rejet aigu à médiation humorale (RHA) chez le porc. Les receveurs d'organe sont pré-immunisés contre leur donneur au moment de l'allotransplantation rénale, mimant la situation clinique des patients dit "hyper-immunisés". Ainsi ce modèle nous permet d'étudier et de tester différentes immuno-interventions innovantes en prévention du RHA.

A partir de ce modèle de receveurs pré-immunisés contre leur donneur, nous souhaitons comparer l'effet de 2 solutions de préservation, contenant des PEG à des concentrations différentes, sur la prévention du RHA en transplantation rénale.

Ce projet se développera selon 3 phases successives : 1) allo-immunisation, 2) perfusion/conservation du greffon (solution contenant des PEG) et 3) allo-transplantation en condition d'allo-immunisation.

Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 16. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, nous utiliserons 1 donneur d'organe pour 2 receveurs. De plus le groupe "contrôle" réalisé au sein de notre laboratoire dans une étude antérieure ne sera pas refait.

Dans un souci de limiter le stress et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale, et un traitement analgésique adapté sera mis en place selon la procédure.

6854. La transplantation, dite ABO incompatible, a connu récemment un essor considérable, du fait des excellents résultats publiés par la plupart des équipes actives dans le domaine, sous couvert de précautions particulières préparatoires à la greffe et d'un suivi et monitoring rigoureux des anticorps. En effet, les survies à moyen et long terme de ces transplantations sont tout à fait équivalentes désormais à celles de greffes ABO compatibles et ce malgré le retour ou la persistance des anticorps anti-érythrocytaires, faisant qualifier ce phénomène d'accommodation. La compréhension de ce phénomène s'avère majeure car il s'agit d'une véritable

protection d'un organe vis-à-vis d'une réponse humorale qui pourrait être déclinée et transposée à diverses autres situations de transplantation comme chez le patient immunisé vis-à-vis de son donneur.

Précisément, outre la transplantation ABO incompatible, la situation expérimentale la plus communément impliquée dans cet enjeu de l'accommodation est la transplantation à travers la barrière du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), dans lesquelles les anticorps anti-donneurs générés vont de première intention agresser l'endothélium. Une des conséquences est que ces patients restent parfois de longues années en liste d'attente, car présentant un taux de greffons incompatibles très important, et certains d'entre eux meurent avant de se voir proposer un greffon. L'induction d'une accommodation, protection de l'endothélium du greffon par les anticorps anti-CMH spécifique, permettrait à la fois d'élargir l'accès aux greffons aux patients hyperimmunisés et d'augmenter la survie des greffons, limitée à une quinzaine d'années en moyenne du fait de la survenue quasi inéluctable d'un rejet chronique à composante humorale.

Nous avons développé un modèle préclinique de rejet aigu à médiation humorale chez le porc. Les receveurs d'organe sont pré-immunisés contre leur donneur avant l'allo-transplantation rénale mimant la situation clinique des patients dit "hyperimmunisés", patients les plus difficiles à greffer car présentant un très fort risque de rejet à médiation humorale aigu (RHA), qui actuellement n'est pas toujours maîtrisable. Ainsi ce modèle nous permet d'étudier et de tester différentes immuno-interventions innovantes en prévention du RHA.

A partir de ce modèle de receveurs pré-immunisés contre leur donneur, nous souhaitons mettre en place de façon complémentaire et innovante un modèle d'accommodation d'un rein transplanté dans un contexte d'allo-immunisation pré-greffe (en présence d'anticorps anti-CMH du donneur).

Cette étude se développera selon 3 phases :

- 1) identification des paramètres d'accommodation *in vitro* à partir de cellules endothéliales du donneur et de différentes concentrations des IgG du receveur,
- 2) mise au point du pré-conditionnement de l'organe selon différentes conditions,
- 3) transplantation d'organes pré-conditionnés selon les conditions définies ci-dessus.

Ainsi dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le nombre maximum d'animaux prévus pour chaque phase est susceptible de diminuer selon les résultats obtenus dans les phases précédentes et selon le nombre d'animaux possiblement inclus dans les phases successives du même projet. De plus les groupes "contrôle" réalisés au sein de notre laboratoire dans des études antérieures ne seront pas refaits. Le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 53.

Dans un souci de limiter le stress et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale, et un traitement analgésique adapté est mis en place selon la procédure.

6855. Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les hormones sexuelles, telles que la testostérone et l'œstradiol, circulent dans le sang liées à un transporteur (SHBG). Seule une petite fraction de ces stéroïdes n'est pas liée et est par conséquent active et capable d'activer une cellule. La biodisponibilité des hormones sexuelles est ainsi directement corrélée au taux du transporteur.

L'ontogénie de ce transporteur chez l'être humain a été étudiée en détail. Les concentrations de SHBG varient en fonction de l'âge ; ses taux plasmatiques sont faibles à la naissance et augmentent de manière progressive chez l'enfant prépubère des deux sexes, pour atteindre des valeurs élevées, supérieures à celles retrouvées chez l'adulte. Cette molécule est un des acteurs majeurs du climat plutôt œstrogénique chez la femme et plutôt androgénique chez l'homme.

La complexité de la régulation de cette protéine et la multiplicité de ses facteurs de régulation expliquent les variations physiologiques et pathologiques de sa concentration plasmatique et les conséquences sur l'équilibre androgènes/œstrogènes. Des corrélations d'intérêt clinique ont pu être faites entre le niveau de ce transporteur circulant et un certain nombre de pathologies. Une diminution des concentrations plasmatiques de ce transporteur est observée au cours des états hyperinsuliniques. Chez la femme obèse, les concentrations de SHBG sont en général abaissées et, inversement, elles augmentent dans les situations de dénutrition telles que l'anorexie. Le taux de ce transporteur augmente en cas d'hyperthyroïdie pour revenir à la normale après traitement, aussi bien chez l'homme que chez la femme. Une concentration élevée est également corrélée à une cirrhose hépatique.

Un hybridome a été développé, sécrétant un anticorps monoclonal (Mab) qui reconnaît spécifiquement ce transporteur. Ce Mab entre dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisé par de nombreux hôpitaux et laboratoires internationaux.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production *in vivo* par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ce Mab n'a pu être caractérisé techniquement et validé cliniquement que sur des lots issus de production en condition *in vivo*. Des essais très poussés ont été menés pour tenter le transfert de cette production en condition *in vitro* (bioréacteur). L'ensemble des résultats concernant la capacité dudit clone à produire *in vitro* le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs IVD (dispositifs de diagnostic *in vitro*) concernés, démontre la nécessité incontournable de poursuivre la production de ce Mab en condition *in vivo*.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs IVD exploitant ce Mab et en l'absence de solution alternative, impose le maintien de la production de ce réactif.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à environ 500 par cycle de production avec un lot pilote de contrôle de 100 souris, le nombre total de souris sera donc de 2600.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.



Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis de nombreuses années, cela permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal. L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée soit par une technique éthiquement acceptable.

6856. L'obésité est devenue depuis 20 ans une pandémie mondiale et la prise en charge de celle-ci et de ses pathologies associées (dyslipidémie, diabète, stéatose hépatique, hypertension artérielle, etc.) constitue un enjeu majeur en santé publique. L'obésité maternelle pendant la grossesse a un impact très fort sur le risque d'obésité précoce de la descendance et sur le développement ultérieur de pathologies cardiovasculaires et métaboliques avec, à terme, une augmentation de la morbi-mortalité. La chirurgie bariatrique (chirurgie permettant de restreindre l'absorption des aliments) s'est progressivement placée au premier rang des traitements efficaces en termes de perte de poids et de résolution des comorbidités, mais il n'existe actuellement aucune donnée clinique ou expérimentale concernant son impact sur la descendance de mères obèses opérées.

Le but de cette expérimentation animale chez la souris est d'apporter des preuves de l'efficacité de la chirurgie bariatrique sur l'amélioration du pronostic pondéral et métabolique des descendants de mères obèses opérées.

Pour cela, nous allons induire une obésité chez 60 souris *C57BL/6* par un régime alimentaire "high fat high sugar" pendant 6 semaines. Ces souris seront alors opérées soit d'une sleeve gastrectomie (intervention restrictive), soit d'un by-pass gastrique (intervention restrictive et malabsorptive), soit d'une laparotomie blanche avec biopsie hépatique simple. Un groupe de 20 souris contrôles non obèses aura également une laparotomie blanche.

Après un mois d'amaigrissement post-opératoire, les souris seront mises en accouplement et suivies quotidiennement durant leur gestation. Après le sevrage des portées, les altérations métaboliques, hépatiques et cardio-vasculaires seront évaluées chez les mères au sacrifice des animaux. Ces mêmes altérations seront étudiées chez les descendants (mâles et femelles) de ces mères à l'âge de 3, 6, 12 et 18 mois.

Au total, en incluant la mortalité opératoire, il est prévu d'utiliser 170 souris femelles, 10 mâles reproducteurs et de suivre 320 animaux de leur descendance. Le respect de la règle des 3R passe par l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux pour obtenir des groupes permettant d'avoir des données statistiquement significatives et l'utilisation d'analgésiques et d'antalgiques adaptés à toutes les étapes du protocole.

6857. Les défauts osseux consécutifs aux pseudarthroses (non consolidation de fracture), fractures complexes, reprises de prothèses et tumeurs concernent de nombreuses interventions orthopédiques. Ces défauts de grande taille peuvent requérir la mise en place d'une greffe osseuse provenant du patient ou d'un donneur, qui présentent des problèmes de disponibilité et/ou de qualité de l'os prélevé. L'ingénierie tissulaire osseuse, qui consiste à combiner un biomatériau et des cellules capables de produire de la matrice osseuse, est une alternative prometteuse. Un procédé innovant de fabrication directe par fusion laser permet maintenant de fabriquer des implants à base d'hydroxyapatite, composé minéral équivalent à celui de la matrice osseuse, ayant une architecture « à façon ». L'objectif de ce projet est d'utiliser ces implants de nouvelle génération pour optimiser la macroarchitecture de l'implant en vue d'améliorer la régénération osseuse par ingénierie tissulaire : différentes architectures de pores seront testées pour leur capacité à supporter le potentiel réparateur de cellules souches adultes. Pour chacune de ces architectures plusieurs densités d'ensemencement cellulaire seront testées.

Ce projet est une phase de pré-expérimentation pour une étude qui a été validée par le comité d'éthique. Pour ce projet, un modèle d'implantation sous-cutané chez le rat sera utilisé pour cribler plusieurs densités d'ensemencement cellulaire des implants de nouvelle génération à base d'hydroxyapatite ou d'hydroxyapatite carbonatée. Ce modèle permet, en effet, de suivre aisément la viabilité des cellules implantées par imagerie bioluminescente et de tester plusieurs concentrations/matériaux chez un même animal. Les résultats obtenus permettront de connaître la densité optimale à utiliser pour une étude prévue en site osseux. En outre, ce modèle permettra également d'évaluer le potentiel ostéogénique propre des implants (en absence de tout contact osseux). Il n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de reproduire la complexité de l'environnement *in vivo* impliqué dans la survie cellulaire et la formation osseuse.

Pour cette étude, nous allons évaluer l'impact de la macroarchitecture et du matériau sur la survie cellulaire et la formation osseuse. Pour cela les implants seront chargés en cellules souches mésenchymateuses de rat puis implantés en sous-cutané pendant 8 semaines. La viabilité cellulaire sera évaluée à J1 et 1, 2, 4 et 8 semaines. La formation osseuse sera évaluée à 8 semaines. 4 types de macroarchitecture (porosité gyroïde, ovale, carrée, fractale), 4 concentrations cellulaires, et 2 matériaux seront testés (32 groupes, pour chaque groupe le nombre d'implant sera de 8, à raison de 4 implants/rat) soit 64 rats.

Par ailleurs, des techniques d'imagerie non-invasives (bioluminescence) seront utilisées pour suivre la survie cellulaire sur le même animal ce qui permet de réduire significativement le nombre d'animaux. Les animaux seront hébergés dans des cages adaptées contenant des copeaux et des structures de jeux et seront à 2 ou 3 individus par cage pour permettre un enrichissement social. Les animaux ne seront mis à mort qu'au temps terminal de l'étude. La souffrance sera limitée par analgésie post-opératoire et contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude.

6858. Les maladies inflammatoires endommagent les vaisseaux et peuvent conduire à des perturbations de perméabilité vasculaire conduisant notamment à des œdèmes. Cependant, les facteurs circulants chez les malades et impliqués dans les changements de perméabilité ne sont pas tous connus. C'est pourquoi nous proposons d'étudier l'impact de sérums issus de malades ayant des artérites ou des maladies inflammatoires rénales sur la perméabilité vasculaire *in vivo* afin d'identifier les facteurs circulants responsables et de pouvoir tester de nouvelles cibles thérapeutiques dans ces maladies. L'espèce animale utilisée sera la souris car l'étude de la

perméabilité induite par les sérums ne peut se restreindre à une étude *in vitro* sur une seule couche cellulaire mais doit être étendue au système vasculaire entier, la paroi vasculaire étant composée de plusieurs couches et les vaisseaux étant plus ou moins perméables selon leur localisation anatomique. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des 3 R, « remplacement/réduction/ raffinement » sera appliquée. Chaque fois que cela sera possible, le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro* ou *in silico* (modèles mathématiques, bioinformatiques). Réduire le nombre d'animaux utilisés consistera à se limiter aux seules expériences absolument indispensables et à utiliser des statistiques lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le nombre total de souris nécessaire est de 100 souris. Le concept de raffiner, autrement dit optimiser l'expérimentation, concerne la méthodologie appliquée aux animaux dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Ainsi, le protocole sera planifié correctement afin d'éviter les perturbations susceptibles de limiter l'expérience et de plus, il sera établi des points limites les plus précoces possible en fonction de l'objectif de l'expérimentation.

Les animaux disposent de nestlets, nids végétal à base de fibres courtes de coton, utilisé comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de réduire l'ennui et de diminuer le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité à l'animal. Les souris immunodéficientes *NMRI-Nude* ne présentent pas de phénotype dommageable. Une expérience pilote a déjà été réalisée dans le cadre d'un protocole précédemment accepté.

6859. L'excitabilité cellulaire, soit la capacité d'une cellule telle qu'un neurone à générer un potentiel d'action, est entièrement dépendante de son potentiel de membrane et des canaux ioniques exprimés par cette cellule. Les canaux potassiques K2P, et en particulier le canal TREK1, joueraient donc un rôle essentiel dans l'excitabilité cellulaire et la transmission d'information dans le cerveau. Leur rôle physiologique dans les différentes fonctions neuronales reste encore peu connu malgré leur implication dans des troubles neuronaux telles la dépression et l'épilepsie. Comprendre le rôle physiologique de TREK1 permettrait de mieux appréhender les pathologies lui étant associées et de le définir comme cible thérapeutique ou gène candidat.

L'étude du rôle des canaux dans l'excitabilité cellulaire implique de pouvoir activer et/ou désactiver rapidement ces canaux. En l'absence de molécules inhibitrices sélectives commercialement disponibles pour ces canaux, cette étude a été rendue difficile.

Nous avons développé une modalité de contrôle du canal TREK1 par la lumière, utilisant une version mutée du gène TREK1 (une seule mutation qui n'a pas d'impact sur la fonction du canal).

Notre projet consiste à introduire cette modification génétique (mutagenèse dirigée par "knock-in") dans l'ensemble des cellules, chez la souris, pour pouvoir obtenir des cellules différenciées représentatives des tissus du système nerveux central d'un mammifère modifiées dans ce sens, et étudier *ex-vivo* leurs propriétés électrophysiologiques. Le contrôle par la lumière du canal TREK1 est réversible et permet d'étudier les effets d'une activation / inactivation rapide du canal sur une même préparation (la cellule étudiée constitue alors son propre control).

En comparant les données obtenues lorsque TREK1 est ouvert à celles obtenues lorsque celui-ci est fermé, il sera alors possible de définir le rôle de ce canal dans différentes fonctions neuronales (excitabilité, communication inter-neuronale).

Aucune lignée de culture cellulaire ne peut reproduire les caractéristiques spécifiques des neurones et l'étude physiologique d'un canal requiert son étude dans un tissu natif, ici utilisé *ex-vivo*.

Il est répondu aux exigences de remplacement par la validation préalable du système de contrôle du canal par la lumière dans des études *in-vitro* déjà réalisées, et par l'utilisation systématique de techniques d'analyses *ex-vivo*.

Notre projet utilisera un maximum de 200 souris, éventuellement jusqu'à l'âge adulte, mâles ou femelles, pour la caractérisation et l'utilisation de cette lignée sur trois générations successives d'animaux homozygotes. Ce nombre est limité pour satisfaire à un objectif de Réduction du nombre d'animaux utilisés et sera suffisant à la caractérisation des phénotypes principaux de cette lignée en élevage.

Notre projet validera les conséquences physiologiques éventuellement associés à la modification génétique du canal TREK1 chez les animaux hétérozygotes et homozygotes pour cette mutation. Des effets délétères de cette mutation pour l'animal ne sont ni attendus ni nécessaires à notre étude. La mise en place de points limites précoces limitera dans tous les cas l'impact pour l'animal, et permettra le Raffinement de la procédure de caractérisation de la lignée.

6860. Le virus Zika est un arbovirus membre de la famille des Flaviviridae comme les virus de la Dengue et de la Fièvre Jaune. Ce virus est transmis à l'Homme par l'intermédiaire d'une piqûre de moustique infecté du genre *Aedes*. C'est par ailleurs, le seul arbovirus pour lequel une transmission sexuelle a été mise en évidence. Présent dans les régions tropicales d'Asie et d'Afrique, Zika considéré comme émergent est responsable de plusieurs épidémies. Depuis 2015, il provoque une épidémie sur le continent américain. Les premiers cas sont détectés au Brésil, pays le plus touché avec plus de 1,5 millions de cas. En février 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) annonce que Zika constitue une urgence de santé publique de portée internationale.

La virose provoquée par Zika se manifeste trois à douze jours après la piqûre de l'insecte vecteur, par divers symptômes, évoquant ceux de la Dengue ou du Chikungunya, eux aussi véhiculés par ce même moustique : fièvre, maux de tête, éruption cutanée, fatigue, douleurs musculaires et articulaires... Silencieuse chez la plupart des personnes infectées, elle reste le plus souvent bénigne, et peut durer jusqu'à une semaine. En revanche, transmis à la femme enceinte, le virus est à l'origine d'un syndrome congénital sévère chez le fœtus, incluant la microcéphalie, associé à un retard mental irréversible.

De plus, un lien de causalité a récemment été confirmé entre le virus Zika et le syndrome de Guillain-Barré, maladie auto-immune inflammatoire du système nerveux périphérique, qui se caractérise par une paralysie ascendante progressive atteignant les muscles respiratoires. Il n'existe actuellement aucun vaccin, ni de traitement spécifique de la virose Zika. Les seuls traitements disponibles sont symptomatiques. En outre, à l'heure actuelle, très peu d'études ont documenté l'infection par le virus Zika.

Au vu de l'émergence de ce virus ces dernières années, il devient donc urgent de développer de nouvelles thérapies pour le traitement de la maladie Zika, en apparence bénigne, mais qui, de par ses complications, pourrait avoir un impact sanitaire grave.

Pour valider l'efficacité de nouvelles thérapies anti-infectieuses avant de les tester chez l'Homme, il est nécessaire de les évaluer dans un modèle animal proche de l'Homme. Les modèles animaux sont essentiels pour comprendre rapidement la transmission et la pathogénèse de ce virus Zika aussi bien que pour évaluer des candidats vaccins.

Ce projet consistera en la mise au point d'un modèle de virose Zika dans le but de caractériser l'infection en réalisant des analyses virologiques, immunologiques et biochimiques. En parallèle, les paramètres hématologiques seront suivis afin de suivre l'état de santé des animaux et de veiller à leur bien-être. Les animaux seront suivis individuellement et très régulièrement tout au long du projet, afin de détecter tout signe clinique anormal et tout signe de douleur : observation clinique biquotidienne, évaluation du stress et de la douleur quotidienne, pesée hebdomadaire. Des points limites sont définis pour sortir l'animal de l'étude si des effets attendus ou inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Afin d'étudier la dissémination virale, les animaux seront euthanasiés et les organes cibles seront prélevés post-mortem. Des prélèvements d'urine et de LCR seront également effectués pour vérifier la possibilité de les substituer aux prélèvements d'organes afin d'éviter l'euthanasie dans les futures études. Bien que l'infection disparaisse spontanément au bout d'une semaine, des mesures seront prises afin de s'assurer de la disparition du virus (prélèvements sanguins...).

Ce projet sera réalisé chez le Primate Non Humain (PNH) du fait de sa proximité phylogénétique avec l'Homme et en particulier en raison des similitudes du système immunitaire et de la qualité des réponses immunes entre ces deux espèces. Ce projet sera constitué d'une procédure expérimentale nécessitant au total 8 PNH. Une fois l'infection caractérisée, cette procédure ne sera pas répétée durant les 5 années couvertes par cette autorisation de projet sauf dans le cas d'une infection par des souches virales différentes. Ce nombre a été réduit au minimum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme. Les PNH utilisés proviendront d'un élevage agréé et l'ensemble du projet sera mené en accord avec la réglementation européenne et nationale.

La mise au point de ce modèle permettra d'évaluer des candidats vaccins en réalisant des études d'immunogénicité et d'innocuité.

6861. Ce projet vise à l'évaluation préclinique d'un nouveau design de système d'aspiration de la moelle osseuse. Traditionnellement, une seringue simple est raccordée à une aiguille d'extraction de la moelle osseuse, et le médecin tire sur la seringue pour extraire la moelle. Il n'y a aucun moyen de contrôler la force avec laquelle la moelle est extraite. A la connaissance des auteurs, aucune littérature n'a été publiée pour décrire le profil de pression de la seringue lors de l'extraction de la moelle, et les auteurs sont actuellement à la recherche d'une réponse à cette question dans une étude distincte. Il a été émise l'hypothèse que la force d'extraction puisse influencer la composition de moelle extraite de façon non homogène, par exemple ; une force d'extraction plus élevée entraîne l'extraction d'éléments moins visqueux de la moelle et inversement. On a par ailleurs émise l'hypothèse que le cisaillement des cellules, les rendant ainsi non viables, peut jouer un rôle dans le nombre de cellules viables extraites.

L'intérêt particulier pour ce projet est l'extraction de cellules souches mésenchymateuses (MSC), qui vont ensuite être purifiées et amplifiées dans le cadre d'une usine de cellules souches en cours de conception dans un des projets européens Horizon 2020. Cette usine a conçu une pompe d'extraction qui permettra un contrôle précis de la pression d'extraction. Dans la forme, le système va ressembler à une pompe à perfusion, mais dans ce cas précis, il va créer une pression négative contre une positive. Il a été montré précédemment que la technique d'extraction peut avoir un effet significatif sur le rendement des cellules souches, avec un groupe revendiquant une amélioration 10 fois supérieure avec un rendement de cellules souches selon leur système d'extraction. Il n'a toutefois pas été élucidé la raison d'une telle amélioration du rendement en cellules souches.

Le but de cette recherche est d'évaluer différentes pressions d'extraction afin d'appréhender leur effet - sur le rendement en cellules souches. Contrairement à la pratique clinique actuelle, la pression d'extraction sera maintenue à une pression constante. Les pressions choisies seront toutes dans la gamme généralement rencontrées dans la pratique clinique courante lors de l'extraction de la moelle osseuse.

Alors que le but de ce projet concerne l'extraction de MSC de la moelle, le projet aura des avantages plus larges en fournissant un outil pour simplifier la procédure clinique courante de l'extraction de la moelle pour d'autres maladies.

Il est proposé d'évaluer 3 différentes pressions d'extraction constante, sur 5 pores pour chaque pression. Des aiguilles d'extraction de moelle osseuse standard seront employées. Seront évalués le nombre de cellules souches et leur viabilité afin de mesurer l'effet de la pression d'extraction.

Le projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Pour tester la sécurité et l'efficacité (temps de procédure, complications) du dispositif d'extraction de la moelle osseuse en phase préclinique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille, permettant d'utiliser des dispositifs d'extraction conçus pour un usage chez l'homme.

Réduction : il s'agit d'une étude pilote et il n'y a pas de bases statistiques pour définir le nombre d'animaux. Le nombre de prélèvements réalisés sur chaque animal (10) et le nombre d'animaux utilisés pour chaque niveau de pression d'extraction (5) ont été optimisés pour réduire au maximum le nombre d'animaux et obtenir des résultats significatifs. Dans le respect du principe de réduction, et sur la base de notre expérience dans le développement de nouvelles procédures, nous estimons que 15 animaux représentent un nombre nécessaire et suffisant.

Raffinement : le projet prévoit des procédures réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle de la douleur peropératoire, sans étude de la survie.

6862. Ce projet concerne l'innocuité d'un produit immunologique destiné à protéger contre une maladie mortelle chez une espèce de carnivore domestique.

La mise en œuvre de ce projet comporte une procédure expérimentale répétitive permettant d'étudier la diffusion et l'absence de virulence de ce produit chez l'espèce de destination.

Cette procédure est conçue en accord avec les textes en vigueur de la Pharmacopée Européenne et avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes expérimentales alternatives car elle répond à l'obligation réglementaire d'être conduite sur l'espèce de destination ;
- un nombre d'animaux envisagé par groupe déterminé en conformité avec la réglementation et dans le but d'obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 152 carnivores domestiques sera impliqué dans ce projet ;
- un hébergement des animaux en groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement
- une adaptation du type de nourriture afin de faciliter l'alimentation et l'hydratation des animaux.
- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal
- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long de la procédure ;
- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

6863. Le projet a pour objectif l'évaluation de traitements mini-invasifs sur un modèle de tumeur VX2 chez le lapin. Différentes études seront réalisées selon le type de traitement testé et selon les objectifs scientifiques (performances, tolérance, efficacité). Notre équipe travaille dans le domaine de l'oncologie et des thérapies innovantes dites mini-invasives des tumeurs. Ces thérapies peuvent être des traitements chirurgicaux par des techniques percutanées, des traitements de radiologie interventionnelle avec guidage en temps réel par radioscopie (embolisation, ablation) ou des traitements pharmacologiques par des thérapies ciblées.

L'utilisation de cellules tumorales VX2 chez le lapin comme modèle de tumeur hépatique a été développée dans les années 50. Le modèle présente l'avantage d'être reproductible, facilement implantable, à croissance rapide et transplantable dans de nombreux organes. De plus, contrairement aux rongeurs, la taille du lapin permet l'utilisation des mêmes appareillages que chez l'homme. Le VX2 est aujourd'hui le modèle tumoral préclinique le plus couramment utilisé en radiologie interventionnelle.

Le projet comprend l'implantation des cellules tumorales VX2 dans le foie de l'animal, le contrôle du développement des tumeurs et les procédures d'interventions classiquement utilisées pour leur traitement.

Principe des 3R :

\* Remplacement : La mise au point, l'évaluation et l'optimisation des traitements anticancéreux nécessitent l'utilisation d'un système *in vivo* reproduisant les conditions pratiques cliniques : conditions d'anesthésie, anatomie et physiologie, matériel utilisé, biologie tumorale pour évaluer la réponse au traitement. En parallèle, des méthodes alternatives de culture de cellules VX2 seront utilisées pour des tests de prolifération/viabilité sur de plus larges gammes d'agents thérapeutiques (screening) ou pour évaluer les mécanismes moléculaires des traitements ensuite testés *in vivo* (microarray, RT-PCR...).

\* Réduction : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude est estimé d'après l'expérience de notre établissement sur le nombre d'individus nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente, classiquement compris entre 4 et 10 animaux par groupe d'étude. Un total de 100 lapins sera utilisé pour les 2 années de la demande d'autorisation de projet.

\* Raffinement : 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.

6864. La propagation des bactéries multirésistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Pour faire face à cette situation, l'idée n'est pas de trouver une solution permettant d'éviter l'apparition de résistances, car les bactéries trouveront toujours un moyen de s'adapter. Il convient plutôt de préserver le plus longtemps possible l'efficacité des antibiotiques disponibles ou d'utiliser une molécule permettant d'améliorer leur efficacité.

*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont des bactéries de la flore commensale pouvant être responsables d'infections nosocomiales et d'infections communautaires. Ces infections sont en générales traitées par les bêta-lactamines. Mais ces bactéries ont particulièrement tendance à développer des mécanismes de résistances aux antibiotiques d'où la nécessité de trouver de nouvelles options thérapeutiques.

Le but de notre projet est d'étudier *in vivo* l'association du cinéole, un booster potentiel d'antibiotique, avec un antibiotique de la famille des bêta-lactamines, l'amoxicilline.

Dans un premier temps, nous étudierons la pharmacocinétique de cette association puis nous évaluerons son efficacité *in vivo* en utilisant plusieurs modèles expérimentaux tels les modèles murins d'infection de cuisse et de pneumopathie ou l'endocardite expérimentale chez le lapin.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche bactérienne ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*). Le nombre de souris et de lapins a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Pour l'ensemble de l'étude, le nombre total d'animaux sera de 2992 souris et 156 lapins. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

6865. Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des cancers agressifs, difficiles à traiter, et leurs causes sont peu connues. Cependant des travaux récents suggèrent un rôle important de p53, une molécule clé dans la mort cellulaire et donc cruciale dans l'élimination des cellules anormales ou précancéreuses.

Nos travaux dans un modèle de souris ne possédant pas le gène p53 (p53KO) ont permis de mettre en évidence un nouveau type de PTCL dont l'origine est un lymphocyte T non conventionnel, appelé NKT. Nous avons montré que ces lymphomes NKT (ou NKTL)

présentent des caractéristiques de cellules activées chroniquement et partagent des points communs avec certains lymphomes humains. Par ailleurs, l'infection des souris p53KO avec une bactérie (*Streptococcus pneumoniae*) augmente l'apparition de ces lymphomes dans les souris. Nous pensons que le développement de ces lymphomes serait associé à la stimulation chronique des NKT par des molécules exprimées par certaines bactéries, comme *Streptococcus pneumoniae*, appelées antigènes glycolipidiques. La protéine AID est une enzyme clé dans la biologie des cellules B. De par son activité mutagène naturelle, elle est depuis longtemps suspectée d'être responsable d'un certain nombre de cancers, et tout particulièrement des cancers liés à l'inflammation. Nous pensons que les lymphocytes NKT activés chroniquement pourraient être particulièrement sensibles à une expression anormale d'AID qui pourrait donc être un acteur majeur de leur transformation. Nous aimerions donc tester l'hypothèse selon laquelle la lymphomagenèse NKT est liée à AID. Pour cela nous croiserons nos souris modèles utilisées jusque-là (souris p53KO) avec des souris AID-KO. Nous observerons alors l'incidence des lymphomes NKT chez ces souris.

Ces résultats, en association avec nos expériences précédentes, devraient nous permettre de mieux comprendre les mécanismes de la lymphomagenèse NKT. Plus globalement, cela renforcera le concept selon lequel certaines bactéries sont capables d'induire des lymphomes par stimulation antigénique chronique.

Il n'existe pour le moment qu'un modèle de lymphome NKT développé par notre équipe à partir de souris p53KO. Si nous voulons étudier l'impact d'AID sur la lymphomagenèse NKT, il nous faut continuer dans ce modèle et utiliser des souris p53KO et AID KO pour tester notre hypothèse. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux pour éviter toute souffrance seront appliqués. 120 souris seront nécessaires pour ce projet.

6866. Ce projet a pour objectif de permettre l'évaluation des effets de candidats médicaments sur les fonctions vitales de l'organisme (cardiovasculaire, respiratoire, système nerveux central et gastro-intestinal). Ces études sont réalisées dans un cadre réglementaire conformément aux recommandations ICH S7A, ICH S7B, S6, S9 et M3 (R2) et sont indispensables avant d'envisager la première administration chez l'homme.

Le présent projet décrit trois différentes procédures de Pharmacologie de Sécurité chez le primate non humain :

- 1/ l'évaluation d'un candidat médicament sur la fonction cardiovasculaire par télémétrie interne chez le cynomolgus conscient,
- 2/ l'évaluation d'un candidat médicament sur les systèmes cardiovasculaire et respiratoire par télémétrie externe et le système nerveux central par une batterie de tests (FOB, Batterie d'Observation Fonctionnelle) chez le cynomolgus conscient,
- 3/ l'évaluation d'un candidat médicament sur le système gastro-intestinal par le test d'absorption d'acétaminophène chez le cynomolgus.

Le choix de l'espèce animale pour les études de pharmacologie de sécurité est basé sur plusieurs critères notamment la réponse pharmacodynamique du modèle animal, le profil pharmacocinétique, et les données préalablement obtenues chez l'espèce considérée (obtenues notamment lors d'études préalables de Toxicologie). Selon la guideline ICH Topic S6 (R1), Step 4 Note for Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Products (EMA/CHMP/ICH/731268/1998 - adopté June 2011), l'espèce primate non humain peut être la seule espèce pertinente pour les essais précliniques des composés biologiques (protéines thérapeutiques, anticorps monoclonaux, vaccins thérapeutiques anti-cancer...). Dans ces conditions les études de pharmacologie de sécurité peuvent être intégrées dans les études de toxicologie réglementaire. Les animaux sont alors équipés d'un gilet intégrant le matériel de télémétrie.

Dans le cadre de nouvelles entités chimiques, des études de pharmacologie de sécurité autonomes sont requises (ICH S7A et ICH S7B). Les animaux sont équipés d'émetteurs télémétriques implantés dans la cavité abdominale de l'animal. Ces émetteurs transmettent par onde radio les signaux cardiovasculaires vitaux tels la pression artérielle, l'électrocardiogramme, la pression ventriculaire gauche ainsi que la température ou les mouvements de l'animal.

Les voies d'administration peuvent être diverses et dépendent de la voie d'administration envisagée chez l'homme.

Du fait de leurs objectifs liés aux différentes fonctions vitales d'un organisme et aux aspects de pharmacodynamie, il n'existe pas de méthodes *in vitro* alternative pour la réalisation des procédures il n'existe pas de méthodes *in vitro* alternatives pour la réalisation des procédures décrites dans le présent projet. L'organisme entier doit être pris en compte dans les évaluations de Pharmacologie de Sécurité.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être évalué à 66 sur trois ans (études autonomes).

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, un schéma en cross-over est utilisé aussi souvent que possible. Ceci consiste à traiter tous les animaux à toutes les doses dans un ordre aléatoire avec une période de récupération entre chaque administration de la substance. Ce design permet de n'avoir qu'un seul groupe d'animaux (entre 4 et 6 animaux) plutôt qu'un groupe par dose à tester. Cela n'est possible que si la toxicocinétique de la substance à tester est connue.

De plus, le nombre d'animaux par groupe est déterminé *a minima* afin d'obtenir des résultats statistiques robustes et d'atteindre les objectifs des études.

Enfin, dans la mesure du possible, les évaluations de pharmacologie de sécurité sur le primate non humain sont intégrées dans les études de toxicologie afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Les animaux sont hébergés par groupe et par sexe dans des cages conformes à la Directive 2010/63. Lors des enregistrements de télémétrie, les animaux ne sont pas en groupe principalement pour des raisons liées à la technologie du matériel (onde radio).

L'état sanitaire des animaux est vérifié à intervalle régulier tout au long des études et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé et via un monitoring en continu pour certain type d'études impliquant l'enregistrement de données physiologiques (signaux respiratoires, cardiaques, système nerveux central). Si nécessaire des soins adéquats seront appliqués pour éviter l'inconfort et si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui

être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, perchoirs, musique).

6867. Les fentes labio-palatines représentent la malformation congénitale crânio-faciale la plus fréquente dans la population générale (1/700 naissances toutes formes confondues). Le traitement chirurgical de cette pathologie doit être entrepris à un âge précoce (4 à 6 mois de vie) afin de limiter au maximum les troubles de déglutition (alimentation possible au sein ou au biberon), et les troubles respiratoires et de développement de la phonation de l'enfant. Cependant, et ce malgré l'amélioration constante des techniques chirurgicales, on retrouve presque toujours un défaut de croissance du maxillaire dû aux tissus cicatriciels engendrés par la chirurgie. Se pose alors un paradoxe croissance/fonction qu'il est bien difficile à résoudre.

Notre projet a pour double objectif, primo, de mettre au point chez le rat une technique chirurgicale permettant de reproduire les séquelles d'une fermeture de fente palatine humaine, pour secundo, pouvoir évaluer l'apport des biothérapies dans leur prise en charge (greffe autologue d'ostéoblastes dans la fente palatine). Le choix du modèle animal s'est porté sur des rats âgés de 4 semaines, c'est-à-dire sur un palais encore en croissance mais d'une taille déjà suffisante pour pouvoir créer chirurgicalement le modèle.

La demande d'autorisation porte sur une durée de 1 an avec un nombre de rats nécessaires égal à 10. Toutes les démarches réglementaires seront entreprises pour que ces travaux soient réalisés dans les meilleures conditions pour les animaux. Les rats bénéficieront d'un environnement adapté, d'une prise en charge de la douleur par buprénorphine, d'une anesthésie générale par kétamine-xylozine, et d'un suivi régulier post-opératoire. L'euthanasie de l'animal sera réalisée selon les règles de bonne pratique par une injection létale de penthobarbital à 4 semaines post-opératoire. Une analyse macroscopique sera ensuite réalisée sur les palais afin d'évaluer l'évolution et la qualité de la cicatrisation. L'absence d'infection et de cicatrisation complète sont les résultats attendus pour pouvoir utiliser ce modèle pour la suite du projet à savoir l'implantation de substituts osseux cellularisés.

6868. La dépression est une pathologie qui touche 10 à 20% de la population. Les antidépresseurs actuellement disponibles en clinique ont un délai d'action substantiel (2-3 semaines) ainsi que des effets secondaires non négligeables. En outre, un tiers des patients dépressifs présente une résistance à ces traitements. Ainsi, le développement de nouvelles molécules ayant un délai d'action plus rapide et de moindres effets secondaires, constitue un réel enjeu de santé publique.

Des dérivés stéroïdiens non métabolisables sont développés à des fins thérapeutiques. L'un d'entre eux, le 3beta-méthoxyprégnolone (MAP4343), a montré des propriétés antidépressives lors d'une première étude préclinique chez le rat isolé socialement puisque que le MAP4343 était capable de prévenir le phénotype anxio-dépressif induit par l'isolement.

L'objectif de notre projet est de consolider la preuve de concept préclinique de l'efficacité antidépressive de notre molécule MAP4343 à l'aide d'un modèle spontané de dépression, et non pas induit par l'exposition à un stress. Il s'agit d'utiliser d'une souche consanguine de rat qui présente un comportement spontané de type anxio-dépressif, et d'observer si notre molécule peut exercer un effet rapide de type antidépresseur.

Les animaux de cette souche, ainsi que ceux issus d'une souche contrôle, seront traités à court-terme par différentes doses de MAP4343. Les effets comportementaux du MAP4343 seront évalués et comparés à ceux d'autres antidépresseurs avérés tels que la fluoxétine, ou en cours de caractérisation comme la kétamine.

Au cours de la réalisation de ce projet, nous nous efforcerons de respecter la règle des « 3R », remplacement, réduction et raffinement. Dans la mesure où une évaluation comportementale est impossible à faire *in vitro*, il n'est pas possible de remplacer les animaux utilisés. Pour la réduction du nombre d'animaux, nous utiliserons un effectif minimum, qui permet cependant d'utiliser des analyses statistiques appropriées. Ce projet nécessitera l'utilisation d'environ 600 rats sur 3 ans. Pour le raffinement, nous éviterons au maximum d'induire un stress chez les rats. Ainsi, les rats ne seront pas isolés et ne seront pas non plus soumis à des expériences provoquant une douleur. De même, les expériences seront immédiatement arrêtées si une dégradation de l'état de santé de l'animal était observée.

6869. Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'AVC est souvent responsable de séquelles qui affectent la qualité de vie des patients. Les atteintes peuvent être motrices, sensitives, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire). En outre, les dépressions sont fréquentes. Par ailleurs, la fréquence et les conséquences des AVC sont augmentées chez les patients présentant une insuffisance rénale chronique (IRC). Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. Un nouveau facteur a été identifié, le facteur inhibant la vasoconstriction. Ce facteur, en agissant sur les récepteurs AT2 de l'angiotensine 2 diminue les vasoconstrictions *in vivo*. De par ces effets sur la vasoconstriction et de par son action sur le récepteur AT2 de l'angiotensine 2, ce facteur pourrait diminuer l'importance des lésions ischémiques lors des AVC. Le but du présent projet est d'évaluer l'impact du facteur inhibant la vasoconstriction sur la sévérité des atteintes ischémiques chez la souris avec et sans IRC. Pour ce faire nous utiliserons des souris sans IRC traitées par le facteur inhibant la vasoconstriction, administré à l'aide d'une mini pompe et nous déterminerons la concentration plasmatique de ce facteur dans un modèle de souris avec IRC afin d'établir des corrélations entre la concentration plasmatique du facteur inhibant la vasoconstriction et la sévérité de l'atteinte ischémique lors de l'IRC. Ces expériences ne peuvent à l'heure actuelle être réalisées qu'avec l'utilisation de modèles animaux, la complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IRC et les AVC ne permettant pas les études *in silico*. Le choix du modèle animal s'est porté sur la souris suite à la possibilité de disposer d'un modèle d'IRC chez la souris au laboratoire. Le nombre d'animaux (200) est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque

d'animaux dans des groupes expérimentaux. La plus grande attention est portée afin d'éviter la survenue de douleurs et de stress chez les animaux. Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences.

6870. Le syndrome de l'X fragile (FXS) représente la première cause héréditaire de déficience intellectuelle et d'autisme. Cette maladie génétique est due à l'absence du produit du gène FMR1, la protéine FMRP. Un modèle animal FXS a été développé chez la souris (Fmr1-KO) où le gène FMR1 a été inactivé. La souris Fmr1-KO récapitule une grande partie des phénotypes observés chez l'Homme (altération de la mémoire, perte d'interaction sociale, hyperactivité, macro-orchidisme, anomalie des épines dendritiques) et constitue un excellent modèle animal de la maladie. Nous avons récemment identifié dans ce modèle comment FMRP contrôle la morphologie et la fonction des épines dendritiques en régulant le niveau des lipides membranaires impliqués dans la signalisation neuronale et la stabilisation des connexions entre neurones. Nos données récentes publiées ouvrent une nouvelle perspective thérapeutique qui va être testée dans ce projet.

Nous allons tester deux approches suggérées par nos résultats : une approche pharmacologique qui utilise une molécule activatrice du mécanisme déficient identifié et une approche de thérapie génique qui utilise le gène trouvé dérégulé. L'objectif de l'étude est de montrer une preuve de principe de ces approches sur le phénotype du modèle souris. Un tel phénotype (altération de la mémoire, perte d'interaction sociale, hyperactivité, macroorchidisme) n'est visible que chez l'animal et il n'existe pas de modèle *in vitro* de substitution.

La mutation génétique du modèle souris (Fmr1-KO) n'a pas d'impact sur le bien-être des animaux.

La molécule testée sur l'animal est approuvée par la FDA (agence américaine autorisant des produits alimentaires et les médicaments) pour une autre indication thérapeutique chez l'homme et son utilisation chez la souris aux doses et durées envisagées a déjà été décrite et n'a pas d'impact visible sur le bien-être de l'animal. Cette molécule n'a cependant jamais été utilisée dans l'optique d'un traitement pour la pathologie FXS. L'étude présentera une première validation de l'action de cette molécule bien connue comme nouveau moyen de traitement possible sur le modèle souris bien établi de la maladie FXS, avant d'envisager des essais chez l'homme. Une étude pilote sera réalisée sur un nombre minimum d'animaux (35) pour définir le mode d'administration (oral ou intrapéritonéale) et la dose la plus appropriée pour l'étude complète. Pour le test pharmacologique, le traitement est administré aux souris (selon le mode défini dans l'étude pilote) pendant deux semaines, représentant un minimum nécessaire établi pour obtenir un effet de la molécule tout en limitant la manipulation des animaux et assurant leur bien-être). Il sera comparé à celle d'une molécule placebo sur des groupes de souris mutantes et sur des souris sauvages avec des tests comportementaux (4 groupes de 15 animaux). Si cette première étude est concluante, l'étude pourra être répliquée sur un deuxième lot de 4x15 souris pour atteindre une puissance statistique suffisante.

Par ailleurs, l'injection d'un système biologique de surexpression du gène identifié permettra de définir l'efficacité thérapeutique d'un système ultra-spécifique et innovant ne nécessitant qu'une injection unique. L'efficacité du procédé de thérapie génique sera abordée par une approche d'injection unique intracérébrale sous anesthésie générale ; ce procédé assure un nombre minimum d'injection contenant la plus petite quantité de matériel pour des résultats les plus efficaces, comme il est actuellement développé sur des patients atteints d'autres pathologies. Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude.

Comme pour l'étude pharmacologique, une étude pilote sur un nombre limité de 18 souris permettra de valider l'approche avant d'entreprendre l'étude complète sur 4 groupes de 15 animaux et une réplification sur un deuxième lot d'animaux.

Un total de 293 animaux sera utilisé pour l'intégralité du projet (incluant une duplication complète des expériences si les premières sont concluantes).

Enfin, afin de réduire au minimum tout stress ou douleur, les animaux seront pesés de façon hebdomadaire et mis à mort dès les premiers signes de perte de poids (>20%) ou s'ils présentent des signes de douleur.

6871. Les infections des voies respiratoires sont une cause majeure de morbidité et de mortalité dans le monde. En hiver, elles représentent un réel problème de santé publique dans les pays développés en raison de leur fréquence et de leur gravité. Les hospitalisations pour maladie respiratoire aiguë induisent un coût important et il n'y a pas à l'heure actuelle de traitement efficace disponible mis à part pour la grippe. Les principales causes de bronchiolite chez les enfants sont le virus respiratoire syncytial (VRS), le métapneumovirus (hMPV) et certaines souches de Rhinovirus/Enterovirus (RV/EV). En outre, ces virus peuvent déclencher des exacerbations graves de l'asthme. Ces virus sont également associés à des maladies graves chez les patients à haut risque comme les immunodéprimés et les personnes âgées.

L'expression clinique de ces infections est variable et la part immunologique et inflammatoire dans cette variabilité reste méconnue. Notre projet de recherche s'orientera sur l'étude de la pathogénie de ces virus et notamment sur les manifestations neurologiques dues à ces virus.

Nous avons précédemment développé des modèles animaux (souris) d'infection à métapneumovirus et à VRS qui nous permettront d'étudier la pathogénie.

Ce projet inclut deux procédures, « 1-Infection expérimentale avec un virus respiratoire » et « 2-production d'un anticorps polyclonal anti-virus respiratoire chez le lapin ».

Les animaux nécessaires à l'étude seront essentiellement des souris (n=507). Un lapin sera nécessaire à l'obtention d'un sérum polyclonal.

Règle des 3R

- procédure 1 : Infection expérimentale avec un virus respiratoire

Les animaux ne peuvent pas être remplacés par une méthode alternative pour l'étude d'une infection respiratoire. La mesure de l'obstruction bronchique, le site et l'ampleur de la réplication et l'induction d'une réponse immunitaire ne peuvent être mesurées qu'*in vivo*.

Des manipulations préliminaires nous permettent cependant de restreindre le champ d'investigation *in vivo*. Par exemple, l'identification des cytokines induites par des cultures cellulaires infectées nous orientera vers celles à rechercher chez l'animal et donc permettra de réduire les groupes d'études et le nombre total d'animaux. Nous avons une expérience solide du modèle souris et connaissons la variabilité individuelle attendue pour les différents protocoles partiels. Ceci nous permet de faire une estimation statistique préalable du nombre minimum et suffisant d'animaux nécessaires afin de maximiser les chances d'obtenir des résultats scientifiques exploitables (par exemple compte tenu de la variabilité individuelle, 10 souris/groupe est nécessaire pour la mesure du titre viral).

Des anesthésiques (kétamine/ xylazine) seront systématiquement utilisés avant infection. Les inoculations sont réalisées sous anesthésie afin de diminuer le préjudice subi par les animaux. Tous les prélèvements d'organes sont effectués après sacrifice. De même, nous avons choisi l'euthanasie la plus adéquate pour les souris, l'injection d'une surdose de kétamine/xylazine est une méthode de mise à mort efficace et rapide.

Des points limites ont été définis (ceux-ci sont décrits dans le projet) et s'ils sont atteints les animaux seront dans ce cas euthanasiés afin d'éviter une souffrance inutile. Ces données seront marquées dans le registre relatif à l'expérimentation. Les animaux seront suivis cliniquement par les expérimentateurs (aspect physique/poids corporel).

Règle des 3R

- procédure 2 : production d'un anticorps polyclonal anti-virus respiratoire chez le lapin.

Le lapin développe une réponse anticorps mais n'est pas malade. Ce modèle est donc pertinent. Le sérum de lapin permet d'éviter les réactions croisées en immunomarquage. Le remplacement des animaux par une méthode alternative comme un modèle utilisant la culture cellulaire n'est pas applicable, seul un sérum de lapin nous permettra d'avoir un titre suffisamment élevé d'anticorps.

6872. Les muscles sont des tissus essentiels au sein de l'organisme. Ils représentent plus de 40 % de la masse corporelle et permettent le maintien de la posture, le déplacement et la respiration. Ils constituent également une réserve protéique importante.

Le muscle est un organe qui est capable de s'adapter et de répondre aux sollicitations, notamment pendant la croissance et avec l'entraînement. Avec l'âge ou l'immobilisation, la masse et la force musculaire déclinent, et de nombreuses pathologies conduisent à une atrophie musculaire, comme par exemple l'anorexie, le cancer et certaines maladies infectieuses (SIDA, Tuberculose) ou auto-immunes (Lupus érythémateux disséminé, hépatite auto-immune).

Des pathologies caractérisées par une atrophie musculaire telles que la dénutrition, la septicémie et la cachexie sont associées à une augmentation du taux circulant de glucocorticoïdes (GC).

De plus, bien que les GC constituent le principal traitement de maladies chroniques telles que l'eczéma et l'asthme, leur utilisation prolongée est problématique car ils induisent des effets secondaires importants tels que l'atrophie musculaire et peut même conduire à des myopathies.

La fonte de la masse musculaire peut conduire à une diminution de la qualité de vie, à des chutes et des fractures osseuses, et a, de ce fait, un coût socio-économique important. L'identification de molécules permettant de maintenir la masse musculaire est donc un enjeu majeur des industries pharmaceutiques. Cependant, celle-ci reste difficile, car les voies de signalisation impliquées dans la régulation de la masse et de la force musculaire sont encore mal caractérisées.

Notre objectif principal dans ce projet est de définir les mécanismes par lesquels les GC régulent la masse et les fonctions musculaires chez des souris de type sauvage et des souris mutantes chez lesquelles le récepteur des glucocorticoïdes (GR) est invalidé dans différents types cellulaires des muscles.

Afin de clarifier le rôle des GC dans la physiologie musculaire, des expériences permettant de déterminer la force, l'endurance, le métabolisme, et la régulation de la masse musculaire par différentes hormones seront réalisées.

- Remplacement : Etant donné que la masse et les fonctions musculaires sont contrôlées par divers facteurs, tels que la charge mécanique, la stimulation nerveuse, le stress, l'état nutritionnel et certaines hormones, notamment les GC, il est indispensable de travailler sur l'organisme entier.

- Réduction : Afin de limiter le nombre d'animaux, des souris ayant subi des expériences non invasives telles que la mesure de force par exemple, seront réutilisées pour effectuer des tests sur l'implication de certaines hormones dans la régulation de la masse musculaire.

Ces études seront répétées au maximum 8 fois sur 6 différentes lignées de souris, étant donné que nous souhaitons réaliser des études de cinétique. Pour effectuer des analyses statistiques solides, chaque étude sera réalisée sur un maximum de 8 souris par condition expérimentale. Cependant si l'étude révèle des conclusions statistiques avant que l'expérience soit terminée, cette étude sera arrêtée et les souris pourront servir à une autre étude dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Vu notre capacité d'élevage et d'analyse, nous étudierons en moyenne 20 souris par semaine toutes lignées confondues, c'est à dire environ 1000 souris.

- Raffinement : Si une des expériences peut avoir des conséquences sur le bien-être de l'animal, des mesures seront prises (utilisation d'analgésiques, compléter l'eau de boisson en sel, suivi du réveil et vérification des points de suture après anesthésie préalable de l'animal, si besoin,...) pour améliorer la vie de l'animal.



6873. Un défibrillateur cardiaque sert à arrêter les arythmies cardiaques létales en envoyant un choc électrique interne. En 2012, 6986 défibrillateurs ont été implantés en France. Jusqu'alors, les sondes des défibrillateurs cardiaques étaient situées dans le cœur, implanté par voie veineuse (endocavitaire). La sonde implantée est connectée au défibrillateur situé sous la peau.

Depuis près de 3 ans, le défibrillateur cardiaque entièrement sous cutané est commercialisé en France. La sonde est positionnée sous la peau devant le sternum et reliée au défibrillateur sous l'aisselle. Environ 300 implantations ont eu lieu en France. Il permet de ne pas mettre de sonde dans le cœur et donc de diminuer le nombre d'infections graves (à diffusion par le sang). L'incidence des infections sur matériel implanté par voie veineuse est de 1,7 % /an.

Lors de l'implantation du défibrillateur, le bon fonctionnement de cet appareil est testé.

- Un trouble du rythme cardiaque grave est provoqué (fibrillation ventriculaire)

- Le défibrillateur reconnaît ce trouble du rythme cardiaque

- Le défibrillateur délivre un choc électrique interne.

Il est reproché au défibrillateur cardiaque avec sonde sous-cutanée d'avoir un temps de charge électrique pour le choc plus long et d'envoyer une énergie plus importante pour délivrer le choc électrique comparé à un défibrillateur cardiaque endocavitaire. Ceci pourrait être à l'origine d'une toxicité cardiaque, cérébrale et générale accrue.

La toxicité cardiaque a déjà été étudiée. Les chocs électriques du défibrillateur avec sonde sous-cutanée seraient moins toxiques sur le plan cardiaque que les défibrillateurs endocavitaires.

Les objectifs de cette étude sont :

- Evaluer la toxicité générale des défibrillateurs avec sonde sous-cutanée comparativement aux défibrillateurs endocavitaires
- Evaluer la toxicité cérébrale des défibrillateurs avec sonde sous-cutanée comparativement aux défibrillateurs endocavitaires
- Vérifier la moindre toxicité cardiaque des défibrillateurs avec sonde sous-cutanée comparativement aux défibrillateurs endocavitaires

Les porcs seront répartis en 2 groupes. Le premier bénéficiant de l'implantation d'un défibrillateur endocavitaire et le second d'un défibrillateur avec sonde sous-cutanée. Les animaux seront implantés sous anesthésie générale. Au cours de l'implantation, une arythmie grave sera déclenchée, l'appareil sera testé et son efficacité vérifiée comme cela est fait en clinique humaine.

L'ensemble de la procédure dure environ 30 minutes.

Outre la surveillance clinique, de nombreuses données seront récupérées dans les mémoires du défibrillateur, l'appareil étant doté d'une fonction de surveillance à distance. La surveillance portera également sur des données biologiques.

Les animaux seront nés et hébergés en élevage jusqu'à un poids de 30kg. Ils sont alors transférés dans notre bâtiment et surveillés quotidiennement pendant 3-5 jours dans des boxes individuels. Si une pathologie est détectée après leur arrivée (absence de prise alimentaire, prostration, manque de défécation, de diurèse) ils ne seront pas inclus dans l'expérimentation.

Ce projet prend en compte la règle des 3R. Ce type d'étude ne peut se faire que sur animal vivant et ne peut être remplacé par un modèle cellulaire ou procédure ex vivo.

Nous avons réduit le nombre d'animaux à 14 porcs au total pour cette étude (nombre minimal permettant une analyse statistique des résultats). Le choix du modèle porcin est justifié par la similitude de son anatomie et de son influx électrique cardiaque avec ceux de l'homme.

Enfin, le raffinement a été pris en compte puisque sur l'ensemble de la durée du projet, les animaux sont hébergés cinq jours en box individuel adapté à l'espèce (d'une surface de 3m<sup>2</sup> et d'1m de hauteur, caillebotis au sol), aux parois permettant de sentir et voir leurs congénères dans une salle commune de 18 boxes. Le cycle nyctéméral est respecté, température constante à 23+/-2°C. La ration journalière respecte les apports journaliers recommandés pour l'espèce. Les signes de mal être seront recherchés. Les traitements anesthésiques et analgésiques ont été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire la souffrance des animaux lors de l'implantation des dispositifs et au cours du suivi. Un cahier de suivi est complété quotidiennement afin de colliger les médicaments administrés, l'ensemble des procédures et le comportement de l'animal.

6874. L'hypothalamus latéral (LHA), petite région à la base du cerveau, est une structure d'importance vitale (régulant la plupart des comportements simples : alimentation, reproduction, thermorégulation etc., mais dont l'organisation reste particulièrement obscure. Le LHA est très hétérogène. Il est constitué de populations de neurones dont certaines ont été caractérisées par l'expression de peptides spécifiques. Certaines de ces populations sont conservées au cours de l'évolution. Elles interviennent dans des réponses comportementales ou cognitives complexes, mais sont aussi impliquées dans des fonctions potentiellement dérivées de leurs rôles primitifs : ainsi cette structure présente des organisations différentes, associées à la grande diversité des répertoires comportementaux des différentes espèces de Mammifères (Ex : Herbivores : Régimes alimentaires pauvres mais sources de nourriture abondantes/Proies/Périodes de repos courtes et fractionnées ; à l'inverse des Carnivores et Primates omnivores : Nourritures riches mais moins abondantes/Prédateurs/Longues périodes de repos-sommeil).

L'hypothèse sur laquelle nous travaillons est que cette structure LHA agirait comme un générateur ou initiateur de comportement « Behavioral pattern generator/initiator » dans le cadre d'un réseau incluant d'autres systèmes neuronaux. Cette structure est ainsi capable de moduler l'expression comportementale en ignorant des signaux de satiété (réponses à des facteurs hédoniques « effet récompense ») ou au contraire intervient dans l'extinction de comportements addictifs. Cette étude est donc cruciale pour comprendre les comportements de dépendance alimentaire générateurs d'obésité.

Les travaux qui font l'objet de cette demande concernent l'étude par traçage génétique de connexions neurochimiques spécifiques de noyaux du LHA récemment identifiés. Pour cela nous appliquerons chirurgicalement sous anesthésie générale des virus (PRV Bartha initialement, puis rAAV). Les virus PRV Bartha ont la propriété de migrer le long des terminaisons et de franchir les synapses permettant ainsi de tracer l'ensemble des neurones interconnectés afin de visualiser un ou des) circuits neuronaux impliqués dans une fonction. Les virus PRV Bartha sont atténués c'est-à-dire qu'ils ont perdu leur virulence, les animaux vivent ainsi beaucoup

plus longtemps sans symptômes après infection. Les animaux seront euthanasiés avant l'apparition de ces symptômes. Les rAAV n'ont aucune virulence et n'infectent les neurones qu'au niveau du site de l'injection. Au bout de quelques jours, les neurones sont transfectés pour les gènes d'intérêt, mais les particules virales ont été éliminées par la souris qui peut alors être manipulée comme un OGM classe 1. Ces virus ne sont pas transmissibles aux primates et donc à l'homme. L'approche *in vitro* ne peut être utilisée comme tentative de remplacement puisqu'il s'agit d'étudier l'organisation du cerveau d'espèces existantes. En ce qui concerne la réduction du nombre d'individus, les effectifs de souris envisagées seront limités à ce qui est nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques fiables pour une publication des résultats, afin que la communauté scientifique puisse bénéficier des données obtenues et ainsi éviter une redondance avec des expérimentations ultérieures. Enfin, pour le volet raffinement, notre expérimentation prévoit un suivi rigoureux de la souffrance et l'interruption de l'expérience au moindre signe de pathologie induite par l'injection virale.

La règle des trois R est ainsi prise en compte dans notre projet :

Remplacer : la souris constitue l'animal le plus bas dans l'échelle phylogénétique susceptible de nous donner des informations généralisables à l'ensemble des mammifères et en particulier l'homme.

Réduire : la formation des personnes impliquées dans le projet et le développement d'approches faisant appel à des modèles génétiques modernes permet de réduire le nombre d'animaux utilisés puisque nous sommes plus fins et spécifiques dans notre analyse. Le nombre total de souris utilisées sera de 680.

Raffiner : de la même manière, ces approches modernes sont plus efficaces à appréhender les mécanismes impliqués dans les processus cérébraux que nous étudions. Des moyens pour supprimer toute souffrance seront appliqués si nécessaire.

6875. Les coccidioses des volailles sont des affections très fréquentes dues à des protozoaires parasites du genre *Eimeria*. Elles ont des conséquences économiques et sanitaires majeures. Dans le cadre d'études pour mieux connaître les coccidies parasites du poulet et de la dinde, et investiguer de nouvelles approches pour contrôler leur développement, il est nécessaire de produire régulièrement sur oiseaux des nouvelles générations de ces parasites pour les avoir toujours à disposition. Les oocystes (œufs) de ces coccidies peuvent survivre un an ou plus, mais au-delà de six mois, une proportion croissante de ces oocystes meurt, rendant impossible leur exploitation, notamment le dénombrement des formes viables et infectieuses. Or, dans nos activités, il est indispensable de maîtriser les doses infectieuses, que ce soit pour les essais de recherche ou pour les formations qui sont mises en œuvre.

Ce protocole est établi dans le respect des 3 R. Remplacement : Il n'existe pas de moyen de disposer de ces parasites autrement qu'en infectant des oiseaux hôtes. Le développement sur cellules *in vitro* a des rendements négatifs (moins de parasites récupérés que le nombre déposé), la cryoconservation (conservation par le froid) permet de conserver les souches, mais pas de les réutiliser rapidement et aux quantités souhaitées.

Réduction : nous devons remultiplier ces coccidies par passages sur oiseaux environ tous les six mois. Il est prévu d'entretenir par passages réguliers six des sept espèces de coccidies du poulet et trois espèces de coccidies de la dinde qui constituent notre collection. Les oiseaux seront infectés par voie orale avec une suspension d'oocystes. Les matières fécales contenant la nouvelle génération d'oocystes excrétés et les contenus intestinaux seront collectés entre cinq et huit jours après inoculation, en fonction des espèces de coccidies.

Pour obtenir les souches inféodées au poulet, pour chaque remultiplication, 16 coquelets au maximum recevront une dose infectieuse inférieure à la dose pathogène minimale afin d'obtenir des parasites sans entraîner de symptômes ou douleurs chez les sujets. Pour les coccidies les moins étudiées, un à deux passages seulement sont prévus, et pour les espèces les plus prolifiques chez le poulet, le nombre d'oiseaux pourra être inférieur à 16. En fonction des espèces de coccidies et de leur utilisation, il est prévu entre une et trois remultiplications par an, pour un total de 13 passages par an, ce qui correspond à 208 coquelets par an.

Pour les souches parasites de la dinde, les effectifs par passage seront de 7 sujets. Trois remultiplications par an sont prévues pour les deux espèces principales, et deux pour l'espèce secondaire en notre possession. Le total de dindes par an est de 56 sujets.

Le projet est demandé pour cinq ans, ce qui représente un total de 1040 coquelets et 280 dindes sur la période.

Les cages sont équipées de perchoirs et de mobiles, en plus d'un éclairage naturel qui permet de respecter le rythme circadien des oiseaux. En cas d'atteinte des points limites définis, une euthanasie compassionnelle sera réalisée.

6876. En France, les cancers de toutes catégories représentent la première cause de mortalité avec environ 30% de décès pour un coût estimé à environ 17 milliards d'euros par an.

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une multiplication incontrôlée des cellules au sein de l'organisme, résultant d'une interaction entre des facteurs génétiques, environnementaux et comportementaux. De nombreux travaux de séquençage à haut débit des tumeurs humaines ont identifié des mutations associées à des cancers sur certaines protéines cellulaires. Parmi ces protéines retrouvées mutées chez des patients atteints de cancer, l'une d'elle permet à la cellule de contrôler la machinerie de dégradation des protéines défectueuses. Ce sont les mutations de cette protéine et leur impact sur le développement tumoral qui font l'objet de ce projet.

Pour cela, nous avons sélectionné 4 des mutations spécifiques sur cette protéine pour lesquelles nous avons montré qu'elles entraînaient une perte d'activité antiproliférative *in vitro* sur cellules en culture. Nous proposons d'introduire le gène responsable de la synthèse de cette protéine normale ou des 4 protéines mutées dans des cellules tumorales humaines et d'injecter ces cellules dans un modèle de souris immunodéficientes, par voie sous-cutanée. Nous suivrons ensuite l'évolution de la prise tumorale par rapport à des souris contrôle.

Nous utiliserons 6 groupes de 10 souris (1 groupe contrôle, 1 groupe protéine normale et 1 groupe pour chacune des 4 protéines mutées), soit 60 animaux. Cependant si la pertinence des résultats obtenus à l'issue de cette première expérience n'était pas suffisante, une deuxième expérience serait réalisée dans les mêmes conditions, augmentant alors à 120 le nombre d'animaux utilisés pour l'ensemble du projet. Ce nombre devrait nous permettre d'obtenir des résultats pertinents en prenant en compte les aléas de la

prise de tumeurs chez la souris. Après injection, les animaux seront contrôlés quotidiennement par le personnel animalier, et tous les deux jours par le personnel en charge de l'expérimentation, qui procédera à une mesure de la taille des tumeurs dès leur apparition. La progression tumorale sera observée pendant une durée maximale de 7 semaines où jusqu'à ce que les tumeurs atteignent un volume maximal de 1 cm<sup>3</sup>. Les animaux seront alors euthanasiés et les tumeurs récupérées pour analyse. Dans un souci de raffinement, et en plus du suivi de l'évolution des tumeurs, le suivi des animaux sera effectué conformément à une grille de score permettant de définir un niveau de douleur/souffrance à partir duquel les animaux concernés seront euthanasiés. Enfin, les animaux seront hébergés à raison de 5 individus par cage, dans un environnement enrichi, conformément aux conditions de l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles NOR : AGRG1238753A.

Ce projet devrait nous permettre d'identifier des mutations de perte de fonction de ce suppresseur de tumeur et d'évaluer leur impact dans l'apparition de cancers. Cette étude aboutira alors à la mise en place de tests prédictifs permettant d'adapter une thérapie ciblée des tumeurs portant ces mutations.

6877. En conséquence du vieillissement, de divers traumatisme ou accidents ou des maladies osseuses (comme l'ostéoporose), le nombre de fractures et de traumatismes osseux augmente considérablement en particulier dans les pays les plus industrialisés où il soulève un problème de santé publique. Dans le domaine de la régénération du tissu osseux, alors que la reconstruction de défauts osseux de taille faible à modérée en utilisant des substituts osseux classiques est techniquement réalisable, la reconstruction de défauts de grand volume reste difficile en raison d'un manque de vascularisation. Ainsi, le développement de nouveaux biomatériaux apparaît nécessaire.

La technique d'imagerie utilisée couramment pour suivre la réparation osseuse est le scanner-CT, car le tissu osseux est dense, et suite à un trauma ou pathologie, la densité osseuse est en général altérée. L'inconvénient de cette technique est l'utilisation de rayonnements ionisants, qui peut empêcher le suivi longitudinal des patients. Une recommandation de l'Autorité de Sûreté Nucléaire (n°2011-DL-0019) a demandé à réduire l'utilisation de scanner-CT au vue de l'utilisation de radiations ionisantes pouvant altérer la santé des patients. L'IRM est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes (T1, T2, diffusion, IRM fonctionnelle, etc.).

Notre projet consiste à suivre par IRM la dégradation des biomatériaux au cours du temps, et d'évaluer l'angiogenèse se formant dans le nouveau tissu osseux. Pour cela, plusieurs séquences IRM seront utilisées afin de détecter les biomatériaux en hypersignal comparé au tissu osseux sain et d'évaluer la formation de néo-tissu osseux vascularisé.

Deux différents matériaux synthétiques (développés dans le cadre d'un projet de recherche collaboratif) seront implantés au niveau condylien chez des brebis adultes sous anesthésie générale. Le suivi IRM des animaux se fera sur 6 mois.

A l'heure actuelle, le développement des méthodes *in vitro* ne permet pas de répondre aux objectifs du projet, l'utilisation d'animaux possédant les mêmes caractéristiques physiologiques et anatomiques que l'homme est inévitable avant d'envisager une application clinique.

Dans la recherche en orthopédie, le mouton est un modèle usuel et reconnu pour les études *in vivo* car, bien que l'anatomie des quadrupèdes soit différente de celle des humains, ils permettent d'aborder les processus biomécaniques, biochimiques et histologiques de la biologie osseuse, en raison des similitudes avec l'homme dans le poids, la taille, la structure des os et des articulations. D'autre part les processus de remodelage osseux sont similaires à l'homme chez cette espèce.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 13 brebis au total pour une période de 2 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. L'implantation de chaque biomatériau à étudier sur les 3 premiers animaux nous permettra de sélectionner le meilleur biomatériau et de réduire le nombre d'animaux à utiliser.

Dans le souci de respecter la règle des 3R, l'équipe projet met tout en œuvre pour optimiser la méthodologie appliquée aux animaux, notamment les conditions de transport et la prise en charge des animaux tout au long des procédures dans l'objectif de limiter la souffrance notamment en fixant des points limites.

6878. Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant l'exploration du système gastro-intestinal par l'intermédiaire de tests validés. Il permet d'écarter des molécules qui auraient des effets néfastes sur la santé humaine, ou de garder des molécules qui pourraient faire preuve d'efficacité dans certaines pathologies

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisé de façon extensive dans la littérature scientifique et est mis en œuvre à grande échelle au sein du laboratoire de pharmacologie générale. Ces tests nécessitent l'utilisation de rongeurs ou de furets et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur le système gastro-intestinal. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre de rongeurs ou furets qui seront nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 9000 pour les rongeurs et de 3000 pour les furets. Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

6879. Le fonctionnement du cerveau repose sur la transmission d'informations chimiques entre les différents types de cellules qui le constituent : les neurones et les cellules gliales. La compréhension de cette communication chimique est un objectif essentiel en neurosciences. Pour détecter les molécules libérées par les cellules du cerveau dans le milieu interstitiel, nous développons des biocapteurs de taille micrométrique qui sont très peu invasifs. Le but de ce projet sera de valider pour la première fois le fonctionnement de ces biocapteurs *in vivo* chez le rat anesthésié, pour la détection de métabolites énergétiques comme le glucose et le lactate, ainsi que de neuromédiateurs comme le monoxyde d'azote. Pour ce faire, les capteurs seront implantés en intracérébral chez des rats anesthésiés pour monitorer en temps réel une stimulation calibrée du parenchyme cérébral. Ce projet utilisera un total de 60 animaux sur deux ans, nous permettant ainsi de valider un important dispositif d'investigation du cerveau qui pourra avoir des applications en Neurosciences. De plus, ces outils de détection pourront à l'avenir fournir de puissants outils de diagnostic pour monitorer le cerveau des patients cérébrolésés placés en soins intensifs neurologiques. Le nombre d'animaux est réduit au minimum pour permettre une interprétation statistique des résultats. Ce projet vient en complément d'une première approche *in vitro* utilisant des solutions standard et destinée à mettre au point les biocapteurs sans avoir recours à l'animal vivant. L'ensemble des expérimentations décrites dans ce projet sera effectué sous anesthésie générale sans réveil avec analgésie locale au niveau du scalp pour réduire la souffrance des animaux.

6880. L'acide sciadonique est un acide gras singulier que l'on trouve spécifiquement dans les graines de conifères, comme certains pignons de pins. La structure de cet acide gras lui confère des propriétés biologiques à bénéfice santé intéressant. Le projet présenté ici vise à décrire les mécanismes d'action de l'acide sciadonique sur le taux de triglycérides sanguin. L'objectif de l'étude consiste 1/ à montrer l'effet spécifique de cet acide gras sur la triglycéridémie, par comparaison à l'huile de graines de conifères jusqu'ici publiée et 2/ à déterminer les mécanismes d'action métaboliques et physiologiques, notamment dans la formation et la sécrétion des triglycérides par le foie. Pour cela deux lots de 8 rats sevrés seront soumis à un régime de croquettes contrôle ou enrichi en acide sciadonique pur, pendant 6 semaines. A l'issue de cette période, le taux de triglycérides dans le sang sera déterminé, le métabolisme du foie sera analysé ainsi que d'autres paramètres physiologiques recherchés. Le nombre de 8 animaux a été choisi parce qu'il est suffisant mais nécessaire à nos différentes mesures afin de réaliser des tests statistiques paramétriques (réduire). L'effet recherché est d'ordre nutritionnel et repose sur la mesure du taux sanguin de triglycérides donc nécessite l'analyse d'un organisme dans son ensemble (remplacer). Enfin, des tests préliminaires réalisés au laboratoire ont permis de déterminer les principaux mécanismes d'action de l'acide sciadonique au niveau hépatique ce qui conduit à une seule expérience *in vivo* dans les conditions optimales pour l'effet physiologique recherché. Une surveillance quotidienne sera effectuée afin de prévenir d'un éventuel effet secondaire encore inconnu (raffiner) puisque le peu d'études sur le sujet ne décrit pas de mal-être particulier lié à cet acide gras que l'animal peut par ailleurs, naturellement trouver dans son milieu naturel (ici dans la litière d'épicéa). Au final, l'étude proposée a pour objectifs 1/ l'analyse métabolique d'un acide gras d'origine végétale chez le mammifère et 2/ la valorisation à moyen terme des graines de conifères comestibles sous forme de compléments alimentaires ; elle aboutira potentiellement à plus long terme au développement d'une approche thérapeutique.

6881. L'angiogenèse est un processus biologique qui consiste en la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus est conduit par les cellules endothéliales. Il est fondamental pour la cicatrisation des tissus et le développement embryonnaire. Cependant, l'angiogenèse aggrave de nombreuses maladies telles que le cancer et les pathologies inflammatoires chroniques. Une dérégulation de ce processus est responsable des rétinopathies. Le projet vise à mieux comprendre une des étapes de ce processus complexe, *in vivo*, en réalisant une étude de la vascularisation de la rétine chez la souris. Nous prévoyons d'utiliser 30 animaux pour ces expériences (3 lots de 10 souris). Les procédures seront réalisées par du personnel formé à l'expérimentation animale et en accord avec la règle des 3R qui préconise :

- Le remplacement des animaux par une méthode alternative quand cela est possible : nous souhaitons valider les expériences réalisées *in vitro* au laboratoire donc nous sommes contraints de passer au modèle animal ;
- La réduction du nombre d'animaux : nous allons inclure 30 animaux dans cette étude repartis en trois groupes de 10 animaux. Pour chaque groupe, nous avons pris en compte : (1) la caractérisation des podosomes dans les cellules endothéliales qui exige de réaliser différents marquages, (2) des difficultés inhérentes à la microdissection et à la fixation des rétines néonatales et (3) de la variabilité expérimentale ;
- Le raffinement favorise le comportement naturel des animaux pour éviter tout stress. Nous serons dans ce cadre attentifs à l'enrichissement du milieu (litière, abris) mais également nous veillerons au bon comportement de la mère vis-à-vis des souriceaux (poche de lait, non isolement).

6882. L'incidence des affections des poches gutturales du cheval est considérée comme relativement rare bien que présente dans la plupart des régions du monde. Avec le développement de l'endoscopie, l'examen des poches gutturales devient un examen de routine qui permet d'améliorer la connaissance de diverses affections. Dans le cas de mycose des poches gutturales, les trois signes les plus communs de cette maladie en association ou non, sont un jetage nasal mucopurulent uni- ou bilatéral, des signes d'atteintes neurologiques tels que de la dysphagie, un syndrome de Claude Bernard Horner, une hémiplégie laryngée ou encore une atrophie de la langue, et de l'épistaxis (saignement du nez) non induit par un effort. D'après les études rétrospectives publiées jusqu'à maintenant, la technique la plus efficace dans la gestion de ces cas reste l'embolisation trans-artérielle utilisant des coils placés sous

contrôle fluoroscopique avec le cheval sous anesthésie générale. La guérison des lésions mycosiques est généralement observée entre une et plusieurs semaines après embolisation. Cependant, nous savons que la guérison peut être très longue dans certains cas. Chez le cheval, le recours à des traitements supplémentaires pourrait être bénéfiques tel que l'utilisation d'oxygène hyperbarique durant l'embolisation. En effet, *Aspergillus* sp. a la capacité de se développer et d'envahir les structures vasculaires et entraîne la nécrose des tissus mous constituant les poches gutturales, conduisant à terme à une hémorragie pouvant être fatale.

Pour obtenir des informations interprétables nous n'avons pas d'autre solution que de travailler avec des animaux vivants et infectés expérimentalement. Pour ce travail, nous utiliserons 6 chevaux (nombre statistique minimal nécessaire pour mettre en évidence l'innocuité clinique). Les animaux seront hébergés sur un plateau technique destiné à la recherche, dans des boxes paillés couverts ou en paddock extérieur commun et soignés tous les jours. Ils resteront au repos et des mesures seront prises pour gérer toute douleur trop importante induite par la mise en place de cette intervention. Nous posons l'hypothèse qu'un traitement adjuvant et innovant localisé dans une poche gutturale de cheval adulte améliore la vitesse de résolution macroscopique des lésions d'Aspergillose dans un modèle d'induction expérimental validé. Les chevaux seront pris en charge par une équipe de vétérinaires et infirmiers spécialisés et expérimentés.

6883. Ce projet s'inscrit dans l'étude du cancer du rein et plus particulièrement du sous-type le plus fréquent, le cancer du rein à cellules claires (ccRCC). Il a été mis en évidence dans 80% des ccRCC une mutation et/ou une délétion du gène *Vhl*. L'étude des 3 isoformes protéiques produites à partir du gène *Vhl* a permis de mettre en évidence *in vitro* et *in vivo* la fonction de suppresseur de tumeur de deux d'entre elles. Cependant, aucune étude scientifique n'a été réalisée afin de caractériser la fonction de la troisième isoforme protéique dans la tumorigénicité rénale chez l'Homme. Pourtant, le transcrite de cette isoforme 3 est surexprimé dans certaines tumeurs rénales alors qu'il est minoritaire dans les tissus sains adultes.

La présente demande est rédigée dans le but de réaliser chez la souris Nude, des xénogreffes de cellules rénales humaines exprimant ou non deux des isoformes protéiques de *Vhl* : celle dont la fonction n'a pas encore été étudiée (isoforme 3) comparée à l'isoforme 1 dont l'effet suppresseur de tumeur est reconnu. Pour cela, des lignées cellulaires rénales exprimant stablement l'isoforme 3 (à étudier) ou l'isoforme 1 (contrôle positif de l'effet suppresseur de tumeur) ont été générées au sein de l'équipe.

L'étude consistera à comparer l'évolution du volume tumoral au cours du temps entre les tumeurs de cellules rénales n'exprimant aucune des isoformes de *Vhl* et les tumeurs de cellules rénales exprimant soit l'isoforme 1, soit l'isoforme 3. La lignée exprimant l'isoforme 1 sera utilisée comme contrôle d'effet suppresseur de tumeur par rapport à la lignée rénale d'origine qui servira de référence pour l'induction de tumeur.

Le point « Remplacement » est respecté puisque tous les tests *in vitro* ont été au préalable réalisés et les résultats obtenus montrent des différences entre les types cellulaires qui justifient d'être validées via cette étude expérimentale. Toutefois, il n'existe pas à ce jour de test *in vitro* permettant de démontrer le caractère suppresseur ou inducteur de tumeur, les expériences de xénogreffes s'inscrivant dans ce projet ne peuvent donc pas être remplacées.

Au total, 16 souris seront utilisées au cours de cette expérience. Ce nombre a été diminué au maximum, tout en permettant une analyse statistique des résultats, afin de prendre en compte le point « Réduction » de la règle des 3R.

Le point « Raffinement » est quant à lui respecté en prenant en compte la notion de bien-être animal dans les points limites. En effet, outre le volume tumoral maximal toléré, une modification du comportement de l'animal traduisant une souffrance ainsi qu'une perte de poids sont des critères entrant dans les points limite de l'expérimentation. En cas d'atteinte de ces points limite, l'animal sera euthanasié.

6884. Le muscle strié adulte a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches appelées cellules satellites. Ces précurseurs musculaires doivent développer des interactions spécifiques avec leur environnement pour assurer la réparation du muscle et le renouvellement de la réserve de cellules satellites tout au long de la vie.

Il a été montré que les macrophages sont indispensables à la régénération du muscle, en agissant à plusieurs niveaux, notamment en stimulant les cellules souches musculaires.

Il a été montré récemment dans d'autres organes, que les macrophages tissulaires ont deux origines possibles : soit ils proviennent de l'infiltration des monocytes circulants, soit ils sont établis au cours du développement à partir de précurseurs fœtaux ou du sac vitellin.

Le projet vise à analyser la contribution respective de ces macrophages au cours de la régénération musculaire et d'en analyser la régulation au niveau moléculaire. Connaître le rôle de ces populations respectives dans la régénération du muscle normal permettra l'établissement de nouvelles connaissances scientifiques, qui pourraient être utilisées dans la compréhension des pathologies du muscle squelettique. En effet, de nombreuses pathologies affectent le muscle, ainsi que le vieillissement ou un exercice physique trop intense et elles sont associées à l'inflammation.

L'utilisation de souris est indispensable à ce projet car on ne connaît pas encore chez l'homme des marqueurs qui permettent d'identifier les macrophages résidents des monocytes sanguins.

Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum après analyse statistiques dès les premières expériences. Les tissus musculaires des animaux sont prélevés et conservés dans une banque biologique constituée dans le laboratoire, ce qui permet de réutiliser les tissus pour des analyses ultérieures en fonction de l'avancement des connaissances sans recours à des animaux supplémentaires. Ce projet est prévu pour une durée de 5 ans et mobilisera un total de 675 souris.

- Réduction de la douleur, souffrance : des anesthésiques sont systématiquement utilisés pendant et au décours des expérimentations afin d'éliminer le stress ou la douleur chez l'animal. Les animaux sont, outre l'observation quotidienne, particulièrement observés au

décours des expérimentations, notamment pendant les heures qui suivent le(s) traitement(s). Les points limite, clairement établis et normalisés par des études internationales, seront strictement observés. Enfin, une attention particulière sera portée au raffinement des protocoles, notamment grâce à l'enrichissement de l'environnement des animaux.

- La totalité des expérimentateurs de l'équipe, en fonction de leur implication et de leur responsabilité sont formés à l'expérimentation animale, y compris les doctorants au cours de leur formation, au niveau I, concepteurs de projets.

6885. La digestion des triglycérides alimentaires est un processus complexe qui débute dès les premières sections du système digestif sous l'action de la lipase pré-duodénale (gastrique chez l'homme, linguale chez le rat) et qui se poursuit au niveau duodénal grâce à la lipase pancréatique. Plusieurs hormones sont sécrétées par le tractus digestif et régulent la digestion et la prise alimentaire. L'une de ces hormones, la ghréline, est produite par les cellules gastriques et déclenche la prise alimentaire et la sécrétion d'hormone de croissance. Pour être active, cette hormone doit être liée dans l'estomac à un acide gras, l'acide octanoïque (ou caprylique, C8:0). L'origine de cet acide gras lié à la ghréline n'est pas clairement définie. Le C8:0 est présent dans les triglycérides des produits laitiers et de certaines huiles et pourrait donc avoir une origine alimentaire. L'hypothèse qui soutient l'étude proposée est donc que le C8:0 présent dans les triglycérides alimentaires pourrait être libéré précocement par la lipase pré-duodénale, être absorbé ensuite directement par l'estomac et se lier enfin à la ghréline dans les cellules gastriques. Cette hypothèse peut être étudiée en inhibant spécifiquement la lipase pré-duodénale.

L'expérimentation présentée ici a donc pour objectif d'étudier l'inhibition sélective de la lipase pré-duodénale chez le rat et ses conséquences sur l'absorption gastrique du C8:0 et sur l'acylation de la ghréline dans l'estomac. L'expérimentation proposée s'inscrit dans un projet de recherche collaboratif. Récemment, l'un des laboratoires partenaires du projet a identifié un inhibiteur spécifique de la lipase pré-duodénale. L'utilisation de cet inhibiteur spécifique va permettre d'étudier sélectivement les mécanismes de lipolyse et d'absorption gastriques associés au C8:0 d'origine alimentaire.

L'animal modèle est le rat *Sprague-Dawley* de 15 jours, allaité par la mère, car l'activité de la lipase linguale est maximale à ce stade physiologique. L'expérimentation proposée inclut 10 femelles et 60 ratons qui recevront des émulsions lipidiques contenant du C8:0 marqué au <sup>13</sup>C, avec ou sans l'inhibiteur de la lipase pré-duodénale. Dix femelles allaitant les ratons seront sacrifiées à l'issue de l'expérimentation. Le projet est conçu pour respecter la règle des 3R : Remplacer, Réduire, Raffiner. Cette expérience nécessite un modèle mimant le fonctionnement du système digestif entier, des glandes salivaires jusqu'à l'intestin et ne peut donc se réaliser que sur un modèle animal (Remplacer). Les portées de ratons, commandées chez un établissement éleveur agréé, contiennent exclusivement des mâles afin de ne pas avoir à sacrifier les ratons femelles (Réduire). Le nombre d'animaux dans chaque groupe est réduit au maximum, tout en gardant une puissance statistique suffisante (Réduire) soit un total de 70 animaux au total. L'émulsion sera administrée aux ratons vigiles avec une seringue en attendant les déglutitions. A l'issue de temps courts (30 minutes et 2 heures) durant lesquels les ratons seront maintenus à une température optimale (cage à 37°C) (Raffiner), les ratons seront sacrifiés et les organes seront prélevés. La procédure sera réalisée 10 fois, avec à chaque fois 6 rats pour des raisons pratiques. On pourra ainsi réaliser les prises de sang et les sacrifices à heure fixe, car les taux de ghréline varient selon les heures de la journée.

6886. Ce projet a pour but de mieux comprendre les circuits neuronaux contrôlant les prises de décisions en lien avec l'état émotionnel de l'individu. Ces systèmes de contrôles sont chez l'homme les circuits dont les dysfonctions engendrent des maladies psychiatriques telles que la dépression, les troubles bipolaires ou de l'anxiété, mais aussi l'addiction. En particulier, nous étudierons le développement et les fonctions d'un sous-circuit majeur le système habenulo-interpédonculaire. Nous avons identifié des gènes de développement essentiels pour que ces sous-circuits se forment normalement et il s'avère que certains de ces gènes sont des gènes de susceptibilité aux maladies psychiatriques citées plus haut. En couplant des approches de pointe chez la souris, telles que l'invalidation conditionnelle ou l'utilisation du promoteur de ces gènes, des analyses électrophysiologiques sur tranches de cerveau, des analyses comportementales de l'anxiété et de la dépression et de l'utilisation de vecteurs viraux pour exprimer des protéines d'intérêt, nous évaluerons les fonctions du système habenulo-interpédonculaire dans un contexte normal ou pathologique. Le type d'animal transgénique principal sera la souris *Otx2Lox/CreERT2* qui sera croisée à des lignées rapporteurs de la Cre. La souris sera donc alors KO pour *Otx2* (n'exprime pas *Otx2*). La souris transgénique est le modèle de choix nécessaire dans ce projet car elle permet l'étude du gène d'intérêt avec un système habenulo-interpédonculaire très similaire entre la souris et l'homme. Tous les efforts seront mis en place pour optimiser l'utilisation de ces souris dans les règles des 3 R. Nous utiliserons un effectif suffisant, 642 animaux, pour réaliser un t-test ou test ANOVA. La taille des groupes et la qualité statistique seront régulièrement réexaminées afin de réduire autant que possible le nombre d'animaux utilisés. Les études histologiques seront réalisées dès que cela est possible en double ou triple marquages pour limiter la quantité de tissu nécessaire. Les expérimentations sont limitées à des injections bénignes et des procédures sans réveil à part pour les injections stéréotaxiques qui seront très localisées et le moins invasif possible mais de classe modérée tout de même avec utilisation d'anesthésiques et d'anti-inflammatoires pour prévenir la douleur. Les phénotypes produits ne portent pas atteinte à l'intégrité des souris et ne causent pas de dommages invalidants, car les souris KO d'*Otx2* sont conditionnelles et possèdent un système inductible pour l'expression de *Otx2* et donc les effets de la délétion sont beaucoup plus limités ; ces animaux vivant normalement 2 ans dans les conditions d'élevage usuelles.

Cette étude permettra d'obtenir de nouvelles informations cruciales pour comprendre le fonctionnement de ces circuits neuronaux et les maladies associées.

6887. Le prélèvement sanguin et la pose de cathéter sont des actes médicaux pratiqués très fréquemment dans les centres de soins. Ces actes techniques sont dans la plupart des cas bénins et sans risque. Cependant, il peut arriver que l'opérateur soit confronté à un

prélèvement difficile dus à des veines peu visibles, profondes, fines et/ou mobiles qui peuvent engendrer des hématomes plus ou moins importants sur le patient. De plus, il existe un risque important pour l'opérateur lorsque le patient présente une maladie transmissible par voie sanguine (VIH, hépatite B et C, ...).

De ce fait, l'automatisation de ces deux actes techniques permettra d'apporter précision et sécurité pour l'opérateur et le patient. Ce projet consiste à évaluer la qualité des prélèvements sanguins et de la pose de cathéter réalisés par l'automate ainsi que tester la reproductibilité de la machine.

L'automate a dans un premier temps était testé sur des mannequins (bras en silicone) mais il est nécessaire de réaliser également des tests sur un modèle animal qui présente un système veineux aléatoire afin de réaliser une preuve de concept et ainsi pouvoir obtenir le « label CE » pour ce dispositif médical de classe IIa.

Le modèle animal choisi est le chien *Beagle* car c'est une espèce qui présente l'avantage de pouvoir réaliser des prélèvements sanguins dans des conditions similaires à ceux réalisés chez l'homme : veines de taille assez proche et pouvant donc être détecté par la machine, volume sanguin circulant assez important permettant la réalisation de prélèvements sanguins d'environ 5 ml.

Pour la réalisation de ce projet, 18 chiens pourront être nécessaires afin d'évaluer la qualité des actes techniques et tester la reproductibilité de la machine (1 étude de 2 chiens et 4 études de 4 chiens). Les animaux seront gardés en vie à la fin du projet.

Chaque étude durera entre 2 et 4 semaines.

Les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre des mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate. Lors des prélèvements sanguins et pose de cathéter, les animaux seront anesthésiés.

6888. L'infarctus du myocarde touche 120 000 personnes par an en France et provoque le décès de 50 millions d'hommes chaque année dans le monde. La reperfusion est le moyen principal pour la prise en charge des infarctus du myocarde mais elle n'est pas dépourvue d'effets secondaires potentiellement délétères. En particulier, les dégâts supplémentaires éventuellement apportés par la reperfusion peuvent avoir un impact sur le remodelage du myocarde infarcté (cicatrice) et du myocarde « sain » (hypertrophie compensatrice évoluant vers la fibrose et la dilatation à long terme). Le P8RI est un pseudopeptide utilisé pour ses propriétés anti-inflammatoires. Des expériences préliminaires suggèrent un rôle protecteur dans les suites de l'ischémie-reperfusion (taille d'infarctus plus petite, remodelage post-ischémique favorable). L'objectif de ce projet est de confirmer les effets bénéfiques du peptide, notamment en termes de protection contre le remodelage pathologique du ventricule gauche et le développement d'insuffisance cardiaque dans un modèle animal préclinique. L'analyse de la fonction cardiaque nécessite un cœur battant et donc un animal vivant. Elle ne peut pas se faire *in vitro*. A fortiori, l'analyse du remodelage et de la fonction cardiaque après un infarctus du myocarde nécessite l'utilisation d'animaux vivants.

L'induction d'une ischémie cardiaque est réalisée par une intervention chirurgicale sous anesthésie générale complétée d'une analgésie. L'état général des animaux est surveillé en post-opératoire afin de s'assurer qu'ils ont bien récupéré leur état de santé normal (sutures, masse corporelle, activité locomotrice...). En cas de constatation d'un signe de souffrance, les animaux sont retirés de l'étude en fonction de points limites prédéfinis.

L'évaluation de la fonction cardiaque par des techniques d'imagerie cliniques tels que l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), techniques indolores, permet de limiter la souffrance et le nombre d'animaux par étude.

Les données de la littérature chez la souris indiquent une utilisation de 10 animaux par groupe : 'sham' (contrôle), 'infarctus' traité avec un véhicule, 'infarctus traité au P8RI, soit 30 animaux par étude. Nous prévoyons de réaliser 4 études/an/espèce, soit 240 souris et 240 rats sur la durée totale du projet (2 ans).

6889. L'atrophie musculaire qui se développe chez des patients atteints de cancer du côlon diminue de manière drastique leur autonomie, conduisant peu à peu à un déconditionnement et une perte de mobilité qui réduisent l'espérance de vie du patient. Ainsi, comprendre les mécanismes moléculaires responsables de cette atrophie permettrait de la prévenir, augmentant ainsi la qualité et durée de vie des sujets. Parmi ces mécanismes moléculaires, le stress oxydant semble être une piste prometteuse puisqu'il a été démontré qu'il était impliqué dans l'atrophie musculaire liée à l'immobilisation mais aussi à d'autres pathologies comme le diabète ou encore les maladies cardiovasculaires. Ainsi, proposer une activité physique régulière, connue pour augmenter les défenses antioxydantes systémiques et musculaires, pourrait permettre de diminuer le stress oxydant musculaire et ainsi ralentir voire prévenir l'atrophie musculaire.

Afin de répondre à cette question, nous devons tout d'abord mettre en place un modèle de cachexie cancéreuse chez la souris. Notre laboratoire a développé il y a quelques années un modèle de souris *Balb/c* ayant reçu des cellules cancéreuses coliques murines C26 en sous-cutané dans le flanc. Ces souris montraient une perte de poids corporel supérieur à 20% en 23 jours, suite à l'injection d'1 million de cellules C26, ce qui ne laisse pas un temps suffisant pour leur permettre de réaliser une activité physique régulière. Dans ce cadre, notre premier objectif est la mise en place d'un modèle de souris C26 développant une cachexie cancéreuse plus modérée. Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons une cohorte de 15 souris *Balb/c* divisée en 3 groupes de 5 souris. Le premier groupe de souris recevra une injection de PBS, en faisant un groupe Contrôle. Le second groupe de 5 souris recevra 0,25 million de C26 en sous-cutané et le troisième groupe recevra 0,5 million de cellules C26. Le poids corporel sera monitoré chaque jour tout comme la prise alimentaire.

Au total, ce protocole nécessitera 15 souris, répondant à la règle des 3R, remplacer, réduire, raffiner.

Remplacement : Notre expérimentation nécessite l'exploration de mécanismes cellulaires et moléculaires au sein du tissu musculaire et tumoral. Il est à l'heure actuelle impossible pour nous de pouvoir effectuer des biopsies musculaires et tumorales sur des populations atteintes d'un liposarcome, et de disposer d'une population d'individus actifs et inactifs suffisamment larges. Aucun modèle « *in vitro* » ne permet d'explorer la cachexie cancéreuse.

Réduction : Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaires pour valider les données obtenues à la fin de la procédure. Les animaux sont hébergés dans des cages individuelles, côte à côte et transparentes permettant de limiter l'isolement social. De la ouate ainsi que des tubes en PVC seront placés dans chaque cage afin d'améliorer le bien-être des animaux. Un total de 15 animaux (5 par groupe) afin d'obtenir un nombre de sujets suffisants pour juger des différences significatives (Estimateur de Kaplan-Meier).

Raffinement : Les animaux sont élevés dans des conditions adaptées (contrôle de température et humidité), locaux confinés, eau et nourriture ad-libitum. Pour les besoins de l'expérimentation, les animaux seront hébergés individuellement mais dans des cages transparentes les uns à côté des autres. Pour limiter les effets délétères de l'isolement social, les animaux bénéficieront d'un enrichissement de leur environnement (tube PVC, coton pour nidation). De plus, le suivi quotidien des animaux (grille d'évaluation de la douleur), du poids et du volume tumoral permettra d'avoir un contrôle continu de l'état de santé des rongeurs et éviter des souffrances inutiles.

Les effets de l'activité physique sur la croissance d'un liposarcome ainsi que ces conséquences délétères sur la santé d'un individu.

6890. L'obésité et la consommation chronique d'alcool constituent les premières causes des maladies du foie en France et sont reconnues comme d'importants problèmes de santé publique. De plus, la proportion de patients obèses avec une consommation chronique d'alcool, développant plus rapidement des complications hépatiques sévères, augmente dangereusement. Il est donc urgent de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces atteintes hépatiques (inflammation) et dans leur évolution vers des maladies gravissimes du foie (cirrhose et cancer du foie) afin de proposer des cibles thérapeutiques. Il a été montré que l'altération des dialogues entre l'intestin et le foie, et le tissu adipeux et le foie, sont une des causes de l'apparition et de l'évolution de ces maladies hépatiques. Notre équipe s'intéresse à la protéine CD44 (molécule de surface impliquée dans les interactions cellulaires) qui régule le recrutement et les fonctions des cellules inflammatoires telles que les macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Le recrutement et l'activation de ces cellules par CD44 dans les trois organes (tissu adipeux, intestin et foie) peuvent réguler les fonctions de ces tissus. De plus, des données de littérature montrent clairement le rôle de CD44 dans la régulation de l'inflammation du tissu adipeux et de la fibrose du foie (dont le dernier stade est la cirrhose). Des études chez des souris exprimant ou non CD44 et soumises à des régimes alimentaires spécifiques (riches en graisses et/ou en alcool) permettront de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans les dysfonctionnements entre le tissu adipeux, l'intestin et le foie connus pour favoriser le développement des maladies hépatiques. Nous nous concentrerons sur le rôle de CD44 dans certains types cellulaires qui n'ont pas encore été étudiés dans ce contexte. Des expériences réalisées *in vitro* sur des hépatocytes isolés, ne permettent pas de mimer la physiopathologie de ces maladies retrouvées chez l'homme et n'ont montré que des effets mineurs. Des procédures expérimentales sur l'organisme entier sont donc nécessaires et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales *in vitro*. Il est à noter que les souris déficientes pour CD44 ne présentent aucun phénotype dommageable comme décrit par leur fournisseur : "les souris sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent aucune anomalie physique et comportementale". De plus, les traitements nécessaires pour mimer les complications induites par l'obésité et l'alcool n'engendrent aucune douleur chez l'animal (le foie est un organe non innervé). Ces études seront réalisées sur un nombre minimum nécessaire de souris (1350 animaux pour toutes les procédures) sans compromettre les objectifs du projet. Le bien-être des animaux sera scrupuleusement pris en compte pour toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tiges en coton et d'igloos dans les cages) et de soins, afin de réduire toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables.

6891. Notre projet propose d'étudier le rôle de l'activation des neurones à sérotonine (5HT) du raphe magnus (une zone du cerveau) dans la transmission nociceptive spinale. La 5HT est un modulateur très connu de la transmission douloureuse. Les neurones du raphe magnus dans le bulbe rostro-ventral sont principalement des neurones à 5HT et la stimulation de cette zone a des effets anti-nociceptifs (antidouleurs) au niveau de la moelle épinière ; ces effets peuvent être reproduits par des agonistes de 5HT. En revanche, on sait également que des neurones du bulbe perçoivent également les informations nociceptives et sont présumés être les neurones du contrôle nociceptif. Ces neurones sont nommés "on" lorsqu'ils s'activent lors d'une stimulation douloureuse et "off" lorsqu'ils sont inhibés pendant cette même période. En revanche, on ne sait rien de leur nature chimique. Le but du présent travail est d'étudier le rôle des neurones à 5HT et de déterminer s'ils sont des neurones "on" ou "off" ou autre.

Pour cela, nous proposons d'utiliser des souris transgéniques issues de la souche sauvage *C57BL/6* qui sera également utilisée pour la mise en place technique. Nous utiliserons un adénovirus contenant le gène de « channelRhodopsine », (une protéine qui forme un canal ionique permettant le passage des ions à travers les membranes, mais uniquement en présence de lumière). Ce gène est sous le contrôle d'un promoteur permettant de n'exprimer la ChannelRhodopsine que dans les neurones à 5HT. Ce virus sera injecté dans le Raphe magnus des souris. Les souris transgéniques obtenues exprimeront la ChannelRhodopsine dans les neurones à 5HT du raphe uniquement. Nous utiliserons une fibre optique pour stimuler ces neurones et nous observerons les conséquences de ces stimulations sur le comportement douloureux et l'activité électrique des neurones relais nociceptifs de la corne dorsale de la moelle épinière. Des animaux seront ensuite soumis à une douleur inflammatoire chronique modérée sur 4 jours. Nous étudierons alors les changements éventuels des effets de la stimulation des neurones à 5HT en condition de sensibilisation à la douleur.

Dans notre étude, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet nécessite une évaluation comportementale. La réduction du nombre d'animaux est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique (hétérogénéité interindividuelle) ; le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux ne dépassera pas 15 animaux. La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de 140 souris.

Pour les procédures où cela est nécessaire, un antalgique sera donné. Les animaux seront surveillés quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation.



6892. Le glyphosate est un herbicide non sélectif à large spectre d'action, appartenant à la famille chimique des acides aminés. Il est utilisé comme désherbant total non sélectif. Le glyphosate a largement été utilisé à travers le monde pour la gestion des adventices, que ce soit pour les pratiques agricoles, la gestion des espaces verts ou par des particuliers. Il s'agit du produit phytosanitaire le plus vendu au monde pour le contrôle des adventices en agriculture, sylviculture et dans les environnements urbains. Récemment, le glyphosate a été accusé de toxicité pour les amphibiens en conditions naturelles. Cependant, les effets du principal métabolite du glyphosate, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA) sont inconnus alors que cette molécule fait partie des substances issues de produits phytosanitaires les plus fréquemment retrouvées dans les cours d'eau en France.

Le projet consiste à examiner le développement d'œufs de crapaud commun (*Bufo bufo*) dans de l'eau présentant des concentrations d'AMPA qui couvrent les valeurs retrouvées dans l'environnement dans un contexte de contamination chronique.

La règle des 3R a été prise en compte de la façon suivante : Le remplacement n'est pas possible car le suivi cible spécifiquement l'espèce en question. La réduction a été prise en compte en limitant au minimum le nombre d'animaux employés (150 œufs, une femelle adulte pond en général entre 5000 et 7000 œufs par ponte). Enfin, le raffinement comprendra le maintien des animaux dans des conditions très proche du milieu naturel.

6893. La naissance prématurée chez l'homme est un problème de santé public qui provoque, entre autres, des apnées du sommeil chez 50% des nourrissons nés avant terme, voire chez 100% des enfants nés en deçà de 1 kg. Ces pauses respiratoires, appelées apnées du prématuré ou ADP, atteignent une fréquence supérieure ou égale à 5 épisodes par heure de sommeil et entraînent des hypoxies intermittentes (diminution du taux d'oxygène accessible aux cellules) dans le cerveau ainsi que dans l'ensemble de l'organisme. Plusieurs méta-analyses ont démontré une corrélation entre la sévérité des hypoxies intermittentes et la survenue d'altérations motrices, de retards d'apprentissage ou encore de socialisation chez l'enfant. Le projet présenté ici consiste donc à déterminer l'impact de l'ADP sur le développement cérébral en nous focalisant sur une structure particulièrement sensible à la prématurité, à savoir, le cervelet. Cependant, l'absence de modèles animaux d'ADP rend difficile l'étude de cette pathologie et de ses conséquences physiologiques. Nous avons donc tout d'abord développé une chambre d'hypoxie capable de mimer l'ADP chez la souris. Notre choix s'est en effet tourné vers ce rongeur pour deux raisons majeures : 1/ le développement du cervelet murin se déroule essentiellement après la naissance, ce qui en facilite l'étude, et 2/ la première semaine postnatale chez la souris correspond, au niveau de la mise en place du cervelet, à un stade de prématurité chez l'homme, ce qui favorise l'extrapolation des résultats. Notre travail poursuit maintenant trois objectifs principaux : i) mettre en évidence les altérations histologiques induites par l'ADP, ii) déterminer les mécanismes électrophysiologiques affectés par l'ADP et iii) définir les conséquences d'une ADP sur le comportement locomoteur et cognitif des animaux. Le nombre minimum d'animaux nécessaire à cette étude est estimé à 18 mères avec leurs portées de 8 souriceaux (soit 162 animaux : 144 souriceaux et 18 mères), lesquels seront divisés en deux groupes, un groupe contrôle et un groupe ADP. Cette répartition permettra d'obtenir des résultats statistiquement analysables, à raison de 2 portées pour chacune des expériences envisagées. Le groupe de souris ayant subi l'ADP sera surveillé pendant et après le protocole d'hypoxie et une grille décisionnelle d'arrêt du protocole sera établie afin de limiter une éventuelle souffrance de l'animal. A terme, cette étude nous permettra de corrélérer la présence de lésions histologiques cérébelleuses avec les déficits observés chez les enfants prématurés, d'ouvrir des perspectives thérapeutiques et faciliter la prise en charge des nouveau-nés souffrant d'ADP.

6894. En France, le cancer représente la première cause de mortalité. Le cancer de l'ovaire se place au 5ème rang des cancers féminins, le cancer de la prostate est la 4ème cause de mortalité par cancer.

Les traitements en oncologie restent encore trop inefficaces, avec un taux de réponse moyen d'environ 20%, et évoluent vers le ciblage de plus en plus spécifique des thérapies, avec un rapport efficacité/effets secondaires bien plus bénéfique pour les patients. Néanmoins, l'efficacité des traitements même ciblés en cancérologie reste encore insuffisante. Le challenge est de disposer de modèles précliniques prédictifs hautement caractérisés pour pouvoir détecter plus tôt dans leur processus de développement les thérapies anticancéreuses efficaces, adaptées à une sous-population ciblée de patients.

Il est désormais communément admis que les modèles de xénogreffes dérivés de tumeurs de patients (PDX), implantés sur des animaux immunodéficients, sans manipulation *in vitro*, reflètent mieux la biologie tumorale humaine que les tumeurs obtenues à partir de lignées cellulaires. L'établissement de ce type de modèles tumoraux offre la possibilité de représenter la diversité génétique des tumeurs et notamment des tumeurs qui ne répondent pas aux thérapies de référence.

Ce projet se focalise sur les tumeurs rares de l'ovaire qui représentent 12% des cancers ovariens et sur le cancer de la prostate. Actuellement, ces 2 types de cancers sont extrêmement mal représentés voire pas représentés en tant que modèles PDX. La collecte du matériel biologique nécessaire, se fera en collaboration avec des services de chirurgie, de clinique, et d'anatomopathologie dans le respect de la réglementation en vigueur à ce jour (consentement éclairé, sérologies, anonymat). Il est prévu de collecter pour chaque type de cancer 50 tumeurs sur 5 ans. Pour améliorer la prise de greffe, les tumeurs rares de l'ovaire seront implantées chez la souris en orthotopique.

Une fois la caractérisation biologique effectuée, la prédictibilité des modèles *in vivo* sera évaluée via des études pharmacologiques avec des molécules de référence (monothérapies et combinaisons), comparaison des résultats obtenus avec les données des patients à travers le suivi clinique. Enfin, les modèles pourront être utilisés pour tester de nouvelles molécules, identifier de nouvelles cibles ou marqueurs de réponse aux traitements, avec un transfert vers la clinique, au bénéfice direct des patients.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril la production de matériel qui sera nécessaire à l'établissement et la caractérisation des modèles. Le nombre estimé de souris pour ce projet est de 780 sur une durée de 5 ans. Une

définition précise des points limites, l'administration d'analgésique en pré et post-opératoire et une surveillance adaptée permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

6895. Les lymphomes cutanés primitifs (LCP) sont des maladies de certains globules blancs appelés lymphocytes. Les patients atteints de cette maladie présentent une accumulation de ces lymphocytes au niveau de la peau que l'on retrouve sous forme de plaques de peau rouge avec démangeaisons et apparition de tumeurs chez certains patients. La fréquence de cette pathologie augmente avec l'âge. Il existe plusieurs types de LCP dont certains restent confinés à la peau et une forme dont les cellules circulent dans le sang. Les patients atteints de cette forme présente la survie la plus faible. On ne sait pas comment se développe ces différentes formes de LCP et si ce sont les mêmes cellules qui sont responsables de la maladie, ni les raisons de leurs capacités migratoires ou de leur transformation en tumeurs. Même si la classification des LCP évolue avec la caractérisation des molécules exprimées à leur surface, les nombreux traitements restent inefficaces. Ceci est dû à la méconnaissance du développement de la maladie liée au faible nombre de modèles d'étude en laboratoire permettant de la reproduire. C'est pour cela que nous proposons de développer des modèles qui mimeraient la maladie chez la souris, permettant ainsi la compréhension des phénomènes responsables de leur croissance et la mise au point de modèles d'évaluation de l'efficacité des thérapies. Aucune méthode non animale ne permet de répondre aux objectifs de notre projet. Sa réussite nécessite de tester chez l'animal différentes voies d'injections de lignées et d'échantillons de cellules issues de biopsies ou de prélèvements de sang de patients. En effet, les capacités de développement des cellules cancéreuses dans les modèles de xénogreffes varient selon les échantillons et les sites d'injection.

Nous demandons 400 souris pour réaliser ce projet sur 5 ans. Nous utiliserons les tests statistiques adaptés et nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux utilisés comme le veut la règle des 3R. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts.

6896. Les maladies cardiovasculaires en particulier l'athérosclérose sont la première cause de mortalité dans le monde. Les facteurs de risques associés sont bien connus. Cependant, ils n'expliquent pas toujours les différences individuelles à développer cette maladie. Des facteurs environnementaux agissant durant la période fœtale et périnatale (grossesse et lactation) peuvent prédisposer aux développements de maladies métaboliques et/ou cardiovasculaires plus tard dans la vie adulte.

Expérience 1 : Impact de l'hypercholestérolémie gestationnelle

Des études cliniques chez l'homme montrent que la présence de facteurs environnementaux pendant la période périnatale et en particulier l'hypercholestérolémie de la mère pendant la gestation pourraient avoir un impact sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance. Lors d'une première expérience nous souhaitons mettre en avant cet effet chez des souris *apoE* <sup>-/-</sup> et *apoE* <sup>+/-</sup> issues de mère ayant un taux de cholestérol normal (*apoE* <sup>+/-</sup>) versus élevé (*apoE* <sup>-/-</sup>).

Cette expérience requiert 202 animaux :

- 50 animaux à chaque point de cinétique (3 points retenus à 15 semaines, 20 semaines et 25 semaines),
- 10 animaux *apoE* <sup>-/-</sup> issus de mères *apoE* <sup>-/-</sup>,
- 10 animaux *apoE* <sup>+/-</sup> issus de mères *apoE* <sup>-/-</sup>,
- 10 animaux *apoE* <sup>-/-</sup> issus de mères *apoE* <sup>+/-</sup>,
- 10 animaux *apoE* <sup>+/-</sup> issus de mères *apoE* <sup>+/-</sup>,
- 10 animaux *apoE* <sup>+/+</sup> issus de mères *apoE* <sup>+/-</sup>)

• ainsi que les animaux mis en reproduction : 32 femelles et 20 mâles

Lorsque le modèle sera mis en place, dans une deuxième série d'expériences, nous allons analyser l'effet d'une alimentation riche en végétaux sur la cholestérolémie et le développement de maladie cardiovasculaire dans ce modèle de souris. Ces expériences entrent dans le cadre d'un « Projet Emergence Collective » de la région Pays de la Loire). Ce projet étudie l'impact des nutriments issus de la pomme et de la carotte sur les maladies métaboliques et cardiovasculaires.

Expérience 2 : Modulation nutritionnelle de l'athérosclérose

Dans un premier temps, nous validerons l'efficacité de ce type d'alimentation chez les souris adultes (n= 60 souris au total). Nous introduirons dans l'alimentation de ces souris des extraits issus de deux pommes et de deux carottes dès le plus jeune âge (sevrage). Nous observerons les effets sur la cholestérolémie et sur l'athérosclérose à 22 semaines (période de développement des plaques d'athérome dans ce modèle). Ces pommes et ces carottes auront été choisies pour leurs effets sur différents types cellulaires (étude en cours dans le cadre du projet). Il y aura 6 groupes d'études (régime contrôle, régime hyper lipidique, régime hyperlipidique supplémenté en pomme 1 et 2 et régime hyper lipidique supplémenté en carotte 1 et 2) et N=10 animaux par groupe

Expérience 3 : Intervention nutritionnelle préventive (période périnatale)

Par la suite (3ème expérience), selon les résultats de l'expérience précédente, nous étudierons l'effet de cette alimentation pendant la période périnatale. Dans les groupes interventions, nous supplémenterons l'alimentation des femelles gestantes *apoE* <sup>-/-</sup> avec les mêmes extraits de pommes et carottes utilisés chez les adultes. Nous garderons un groupe témoin sans supplémentation. Nous regarderons l'impact de ces interventions sur le profil lipidique des mères gestantes et nous étudierons l'impact sur le développement de l'athérosclérose dans la descendance.

Cette étude requiert le même nombre d'animaux que dans l'expérience 1, les mères sont simplement supplémentées pendant la gestation et la lactation avec la pomme et/ ou la carotte ayant eu le plus d'effet au cours de l'expérience 2. Les animaux ne subiront que très peu de contraintes et la douleur sera minime. Les échantillons de pomme et de carotte seront intégrés aux granulés et donnés ad libitum. La première expérience nécessite un génotypage qui sera réalisé au moment du sevrage à partir d'un petit bout de queue. Les souris seront identifiées par des bagues au niveau de l'oreille pour effectuer le suivi. Les rares prélèvements de sang seront effectués au niveau de la queue sous anesthésie locale ou de la veine submandibulaire (en fonction des quantités nécessaires). Les

prélèvements sont réalisés au niveau de la queue (<7.5%) et veine submandibulaire (>7.5% et <10%) pour des tests de tolérance au glucose ou à l'insuline, une semaine avant la mise à mort.

500 animaux seront donc utilisés au total.

Les animaux sont mis à mort par ponction intracardiaque sous anesthésie générale, on cherchera d'abord à évaluer la taille des lésions aux niveaux des artères. En outre, le sang et les organes des souris seront utilisés ou conservés pour des études à venir.

La règle des 3R sera appliquée : le nombre d'animaux pour chacune des expériences a été fixé en fonction des études antérieures publiées et de façon à minimiser leur nombre tout en permettant une exploitation statistique des résultats.

L'ensemble des cages bénéficient d'un environnement enrichi (tunnel,...). Les souris seront surveillées au minimum une fois par jour. Dans le cas, d'une dégradation de leur état (évaluée par une table tenant compte du poids, de l'apparence général et du comportement), au-delà d'un score de 5, les animaux seront placés sous antidouleurs : buprénorphine en sous cutanée à une dose de 0.05mg/kg (injection de 50µL) toute les 8h sur une durée de 24h. Au-delà d'un score de 8, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale.

Dans le cas d'une dégradation de l'état de santé, les prélèvements de sang seront stoppés momentanément jusqu'au rétablissement de l'animal.

6897. Rôle de la restauration de la fonction nerveuse dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans un contexte diabétique. Le diabète est associé à un déficit du processus de genèse vasculaire et à des altérations de l'homéostasie nerveuse. Après une longue période de diabète, il en résulte une insuffisance de perfusion du sang dans les jambes, pouvant aboutir à l'amputation chirurgicale d'orteils, du pied, ou même de la jambe atteinte. La faible efficacité des traitements existant souligne la nécessité d'approfondir la connaissance de cette maladie et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. On sait depuis peu que le développement des nerfs et des vaisseaux est très étroitement lié et obéit aux mêmes mécanismes. En particulier, les sémaphorines et les nétrines sont des molécules impliquées dans le développement du système nerveux de l'embryon, et peuvent également participer à la réparation d'anomalies nerveuses chez l'adulte.

Notre hypothèse est qu'il est possible, en agissant sur les voies dépendantes de ces molécules de guidance de restaurer la fonction du nerf dans la jambe du patient diabétique, et en même temps, de favoriser la croissance de nouveaux vaisseaux, permettant de fait le rétablissement d'une perfusion sanguine adéquate. Cette étude est une étape vers le développement de nouvelles approches thérapeutiques ayant pour objectif de traiter les neuropathies périphériques (maladies des nerfs des membres inférieurs), d'augmenter le nombre et la qualité des vaisseaux sanguins et d'améliorer la perfusion sanguine dans les membres inférieurs des patients diabétiques.

Notre étude, faisant intervenir les relations entre le système vasculaire et le système nerveux, ne permet pas le remplacement des expériences *in vivo* par des expériences *in vitro*.

Le nombre total d'animaux est de 680 (dont 240 sauvages et 440 transgéniques). La réduction du nombre d'animaux a été obtenue par la réalisation des seules expériences indispensables, par l'exploitation maximale des animaux (évaluation de la fonction nerveuse comportementale, de la fonction nerveuse électrophysiologique et mesure du flux nerveux sur les mêmes animaux, la réalisation de la microangiographie et des analyses histologiques sur les mêmes animaux, la limitation à 10 animaux par groupe et l'absence de redondance entre les groupes. Le raffinement a été obtenu par l'utilisation de nombreuses variétés d'animaux transgéniques permettant d'optimiser les expériences et par la prévention systématique des douleurs grâce à un protocole antalgique précis.

6898. Au cours du processus de transformation et tout au long de sa vie, la cellule cancéreuse produit des signaux qui sont précisément contrôlés dans les conditions normales. Certains de ces signaux dépendent d'interactions entre les protéines à l'intérieur de la cellule. Nous avons identifié des molécules qui bloquent les interactions d'une protéine clé avec ses partenaires, induisant ainsi la mort de la cellule cancéreuse. De façon très intéressante, les cellules traitées par ces molécules présentent des marqueurs permettant de prédire une activation du système immunitaire. Ceci est une observation très importante aux vues des récentes avancées en immunothérapie, et permettrait d'envisager un traitement combinant les molécules avec les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité.

Le but de ce projet est de prouver l'efficacité de la molécule sélectionnée dans des modèles animaux.

Nous allons respecter la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Remplacement : Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. Les méthodes alternatives, quand elles existent seront utilisées (détermination des métabolites du produit sur cellules ou modèles cellulaires) mais ce projet nécessitera des animaux vivants. Réduction du nombre d'animaux utilisés en réalisant une étude de tolérance aiguë après administration unique. Réduction : coupler l'évaluation de la tolérance chronique à l'efficacité pharmacologique du médicament candidat, permet de diminuer le nombre d'animaux vivants. Raffinement : des méthodes pour éviter la souffrance des animaux seront utilisées.

Le nombre de souris total pour les 9 procédures est : 500.

6899. La prévalence à l'allergie alimentaire chez l'enfant est, dans les pays développés, en pleine expansion. Cette maladie chronique se traduit par une hyper réactivité immunitaire d'une personne au contact d'une molécule appelée allergène. Cette maladie, qui a vu son incidence dans les pays développés augmenter, devenant ainsi un réel problème de santé publique, possède de nos jours aucun traitement thérapeutique.

Les conséquences d'une réaction allergique chez un patient peuvent l'amener à développer des complications et réactions secondaires sévères pouvant le conduire dans des cas extrêmes à un choc anaphylactique pouvant lui être fatal (cas pour l'arachide).

Le patient allergique est ainsi réduit à une extrême vigilance et une restriction dans son régime alimentaire modifiant sa vie de tous les jours.

De plus, il s'avère que les mécanismes immunologiques entraînant ce dysfonctionnement face à un allergène restent pour l'instant assez méconnus.

Actuellement, plusieurs types de traitements en cours de développement permettent de renverser la sensibilisation vers une désensibilisation.

Cette étude portera sur:

-La caractérisation des cellules générées par les traitements de désensibilisation à une allergie alimentaire.

-L'étude, la compréhension et la comparaison des phénomènes immunologiques induits par ces cellules après traitement.

Dans le cadre de ce projet, nous appliquerons la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement).

Remplacement :

Dans notre cas, nous nous focaliserons sur le modèle murin. Concernant l'induction de l'allergie, l'espèce souris est un modèle très utilisé en pathologie immunologique telle que l'allergie en raison des nombreux outils mis à disposition pour l'analyse des réponses immunes. Cette espèce est également proche de l'homme en ce qui concerne certains marqueurs de la réponse immunologique. De plus, Il n'existe à ce jour aucun autre modèle alternatif (méthode *in vitro*) mimant aussi bien les signes cliniques de l'allergie alimentaire présents chez l'Homme.

Réduction :

Le nombre d'animaux prévu à l'étude s'élève à 4980 souris. Cette évaluation du nombre d'animaux par groupe sera suffisante pour générer des mesures nous permettant de réaliser des analyses statistiques cohérentes et robustes (tests non paramétriques Kruskal Wallis / Mann-Whitney), nous permettant ainsi de mettre en évidence l'efficacité ou non du traitement. Cette évaluation du nombre de souris prend aussi en compte la possibilité de dupliquer et confirmer les résultats obtenus.

La stratégie pour réduire le nombre d'animaux reposera sur une expérience préliminaire permettant, d'une part, de valider le modèle expérimental et d'autre part, de définir les meilleures conditions de traitement.

Raffinement :

Le bien-être des animaux est également pris en compte. Les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier cartonné permettant la nidification, maisonnette, musique).

Une surveillance quotidienne est réalisée sur tous les animaux en cours de protocole. Toutes les observations (graduées par des points limites spécifiques liés à l'expérience) sont enregistrées dans des tableaux d'observation manuscrits, insérés au rapport d'étude.

6900. Objectif scientifique : Les Tumeurs Neuroendocrines (TNE) sont des tumeurs rares et hétérogènes dans leur présentation anatomopathologique et clinique. Cela rend le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique particulièrement difficiles, d'autant que la majorité des patients présentent déjà des métastases au moment du diagnostic. Les modèles d'étude actuels ne suffisent pas à comprendre précisément les processus de tumorigenèse impliqués. En outre, leur faible taux de prolifération ainsi qu'une probable dérégulation de l'apoptose entraînent une grande résistance de ces tumeurs à la plupart des chimiothérapies conventionnelles. Le but de ce projet est de mettre en place de nouveaux modèles précliniques afin d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet les modèles d'études de ces tumeurs sont peu nombreux ; les lignées cellulaires en particulier sont souvent issues de modèles murins et leur petit nombre ne peut refléter la grande hétérogénéité de ces tumeurs.

L'utilisation de nouveaux modèles cellulaires développés à partir d'échantillons de tumeurs fraîches humaines dans les modèles de xénogreffes validés dans nos études antérieures est donc indispensable à une meilleure compréhension de ces tumeurs. De plus, le modèle PDX (pour Patient Derived Xenograft) qui consiste à greffer un fragment de tumeur de patient chez une souris immunodéprimée, est actuellement un modèle pertinent et largement utilisé pour étudier la biologie des tumeurs et pour tester l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques, avant la mise en place d'essais cliniques chez l'homme.

Retombées attendues :

Ce projet a des applications directes à court terme afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients porteurs de TNE. De nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses actuellement étudiées *in vitro* pourront ainsi être validées dans des modèles plus représentatifs, permettant ensuite d'envisager leur essai en clinique humaine.

Ce projet permettra également d'améliorer la compréhension des mécanismes de progression tumorale qui est un prérequis à une meilleure prise en charge thérapeutique des TNE.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Le modèle PDX apparaît comme le modèle le plus pertinent pour étudier le comportement particulier des TNE. Les modèles de xénogreffes caecale et splénique sont largement utilisés au niveau international. Ils sont nécessaires à la validation de nos études *in vitro*. Les tests thérapeutiques effectués sur les animaux reposent sur des résultats déjà obtenus ou en cours de validation *in vitro*. Ils sont une étape nécessaire avant la mise en place d'essais chez l'homme.

Le nombre d'animaux/groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats, les protocoles reposant sur des procédures maîtrisées par les expérimentateurs.

Nombre total d'animaux inclus dans le projet : 1714 souris

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent la réalisation des procédures expérimentales dans des conditions optimales.

6901. Malgré l'existence d'un vaccin préventif, l'infection par le virus de l'hépatite B (VHB) demeure un problème de santé publique avec environ 400 millions de personnes infectées chroniquement dans le monde et risquant de développer une cirrhose voire un cancer du foie. Aujourd'hui, environ 1 million de décès/an dans le monde sont dus aux conséquences hépatiques de l'infection chronique par le VHB. Le traitement actuel le plus utilisé est un traitement « à vie », basé sur des analogues de nucléosides permettant de contrôler la réplication virale et l'évolution de la maladie mais ne permettant pas l'élimination du virus, qui persiste dans les cellules infectées. Dans ce contexte, il existe un réel besoin médical de développer de nouvelles approches thérapeutiques, notamment de type immunothérapie qui permettraient d'induire une réponse immunitaire cellulaire appropriée. Cette dernière conduirait à l'élimination du virus *via* des mécanismes non-cytolytiques et cytolitiques, qui inhiberaient la réplication virale, détruiraient les hépatocytes infectés et supprimeraient de fait l'infection chez les patients porteurs chroniques du VHB. Ce projet concerne un produit d'immunothérapie de ce type, basé sur un vecteur viral non répliquatif codant pour des antigènes du VHB, qui est en développement clinique chez l'homme. Dans le but d'améliorer l'immunogénicité de ce produit et de permettre de traiter une plus large population de patients atteints d'hépatite B chronique, nous souhaitons aujourd'hui évaluer dans des études précliniques, un schéma d'immunisation atypique basé sur une première administration du produit par voie sous-cutanée (SC) suivi d'une injection de rappel par voie intraveineuse (IV) chez des animaux présentant ou non une immunité préexistante contre le vecteur viral utilisé. Bien que le modèle murin ne reflète pas complètement la réponse cellulaire et humorale chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer de façon efficace la capacité de notre produit d'immunothérapie à induire des réponses immunitaires spécifiques contre le VHB. A l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle murin pour notre étude. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum, sans compromettre les objectifs du projet. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. Ce projet inclura un maximum de 152 souris.

6902. L'induction d'une immunité par vaccin permet d'obtenir facilement des anticorps circulants dans les modèles animaux. Ces anticorps sont peu efficaces pour lutter contre les tumeurs. L'obtention de lymphocytes cytotoxiques (CTL), plus intéressante dans le cancer, est plus difficile à obtenir car les adjuvants disponibles actuellement donnent généralement des réponses faibles.

Nous travaillons sur un adjuvant immunitaire (constitué d'un petit fragment d'ADN synthétique mimant les propriétés de l'ADN bactérien) qui, associé à un antigène, permet l'obtention de CTL chez la Souris. Cette réponse reste cependant encore insuffisante. L'obtention d'une liaison étroite entre l'antigène et l'adjuvant est censée améliorer l'efficacité des vaccinations.

Notre projet a pour donc but d'associer à la fois un antigène, notre adjuvant et un agent polymérisable dans le but d'induire une immunité optimale. Au cours des derniers mois, nous avons mis au point diverses formulations et nous avons sélectionné les plus prometteuses à l'aide de mesures physicochimiques (microscopie électronique, électrophorèse, chromatographie, ...) et de tests *in vitro* sur des cultures de cellules immunitaires. L'efficacité des formulations retenues à l'issue de ces tests *in vitro* doit être confirmée *in vivo*, chez la souris, qui constitue l'espèce la plus adaptée pour les études immunologiques. Les principales étapes de ce projet sont :

1-Comparaison de différentes préparations vaccinales, injectées en sous cutané, chez la souris, avec analyse de la réponse immunitaire (CTL),

2-Etude histologique locale après immunisation sous-cutanée chez la souris, en utilisant la formulation optimale retenue à l'étape 1,  
3-Essai fonctionnel chez la souris avec immunisation contre un antigène tumoral puis évaluation de l'inhibition de la croissance d'une tumeur implantée en sous-cutané.

L'étude chez l'animal est indispensable pour mesurer une réponse immunitaire par lymphocyte. Cependant, le nombre d'animaux est réduit au maximum (généralement 8/groupe) pour permettre une analyse statistique fiable des résultats.

Les protocoles sont optimisés en utilisant des modèles validés par la littérature, donnant des résultats reproductibles, et les expériences sont conduites dans des conditions peu traumatisantes (injection sous cutanées), respectant au mieux les animaux. Enfin, les corrélations entre les résultats obtenus chez les souris et les résultats obtenus *in vitro* seront étudiées en permanence dans l'objectif de remplacer le modèle *in vivo* par la prédiction *in vitro* lorsque cela est possible. Au total, 1110 souris seront utilisées dans ce projet.

6903. Le diabète de type 2 est une pathologie humaine dont la prévalence mondiale ne cesse d'augmenter. L'impact de cette pathologie sur la santé de la population et les conséquences économiques liées à la prise en charge des patients incitent à poursuivre les recherches nécessaires au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le diabète de type 2 se caractérise par une insulino-résistance, conduisant à une hyperinsulinémie et une hyperglycémie. Les approches *in vivo* développées actuellement reposent principalement sur l'induction de la pathologie dans des modèles murins à l'aide de régime alimentaire enrichis. Cette approche demeure longue (plusieurs semaines voire plusieurs mois) et extrêmement coûteuse en animaux. L'antagoniste du récepteur à l'insuline (S961) est un peptide mimant rapidement les effets physiopathologiques observés chez les sujets diabétiques : insulino-résistance, hyperglycémie, hyperinsulinémie. L'utilisation d'une telle molécule permet d'induire ces perturbations rapidement (7 jours) et de manière réversible limitant ainsi le temps d'expérimentation sur les animaux. Par ailleurs, la perturbation du rythme circadien est connue pour influencer d'une part l'apparition du diabète de type 2 et d'autre part les cinétiques d'expression des récepteurs nucléaires. C'est pourquoi cette étude sera réalisée sur deux créneaux horaires distincts (jour vs nuit) nécessitant la mise en place d'un décalage horaire des animaux. Pour chaque créneau horaire, 75 souris seront utilisées : 15 souris seront euthanasiées au début de l'étude (contrôle J0). Trente souris seront traitées par le S961 pendant 7 jours et mises à mort à la fin du traitement (15 individus) ou 7 jours après l'arrêt du traitement (15 individus). De la même façon 30 animaux seront traités par une solution saline iso-osmotique et euthanasiés 7 ou 14 jours après le début de traitement, soit un total de 150 souris. Cette étude ne peut être réalisée qu'à l'aide de souris afin de prendre en compte à la fois, l'insulino-résistance, l'hyperglycémie et la rythmicité circadienne.

Toutefois, dans le but de remplacer au maximum les animaux utilisés nous disposons de modèles cellulaires au laboratoire qui seront utilisés pour mettre en évidence les mécanismes moléculaires impliqués. Nous étudierons l'impact de cette insulino-résistance dans un grand nombre d'organes (foie, cœur, cerveau, intestin, muscles et tissu adipeux) en impliquant l'ensemble des équipes constituant notre unité dans le but d'utiliser au maximum le matériel biologique généré au cours de cette étude (réduction). Enfin, une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent la réalisation des procédures expérimentales dans des conditions optimales (raffinement).

6904. La procédure décrite dans ce projet correspond à la création de tumeurs chez le rongeur. L'objectif de ce projet est de créer différents types de tumeurs chez la souris ou le rat, après administration de cellules tumorales, de mesurer différents critères (taille de la tumeur, survie...), et de tester l'efficacité d'anticancéreux. La création de ce type de modèle dans ce projet ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car l'induction de tumeur s'accompagne de modifications physiopathologiques ne pouvant pas être reproduites *in vitro*, ces modifications étant nécessaires pour l'étude d'efficacité d'anticancéreux. L'utilisation de la souris ou du rat comme espèce hôte se justifie par le fait que ces espèces développent rapidement des tumeurs après injection de cellules tumorales et qu'il s'agit des espèces les mieux décrites dans la littérature pour ce type de modèle. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé de façon à permettre une interprétation correcte des résultats, évitant ainsi une répétition du test. Sur ces modèles induits, un effectif de 12 animaux par groupe semble un minimum. Un test comportera 4 groupes (un contrôle, un anticancéreux de référence, et deux doses de substance test), soit 48 animaux par test. Par ailleurs, nous estimons à 15 le nombre de molécules qui seront testées par an, sur les 5 prochaines années (*i.e.* 3600 animaux). Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègre dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant d'euthanasier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'angoisse.

6905. Lors du développement de nouveaux médicaments et/ou sondes d'imagerie, il est nécessaire d'étudier la façon dont la molécule d'intérêt se distribue et est éliminée de l'organisme. Pour cela, si aucune donnée de littérature n'existe, nous vérifierons d'abord sur culture cellulaire que le composé étudié n'exerce pas de toxicité. Nous procéderons ensuite au radiomarquage de la molécule (ajout d'un isotope radioactif) puis au contrôle *in vitro* de la préservation de l'activité biologique de la molécule suite à ce marquage. Ce n'est qu'ensuite que nous administrerons la molécule radiomarquée par voie intraveineuse à des souris afin de suivre celle-ci dans le temps par imagerie nucléaire. L'espèce de choix pour l'étude de la bio-distribution de ces composés est la souris mais certaines études réglementaires nécessitent l'utilisation de rats et certains modèles pathologiques de rat sont plus représentatifs de la maladie cancéreuse humaine que la souris. Notre projet déposé chez la souris nécessite donc un avenant pour pouvoir travailler chez le rat. Pour chaque étude (estimation de 2 études par an, 1 réalisée sur rats sains et 1 sur rats porteurs de tumeurs), nous formerons 4 groupes d'animaux (n=8 animaux par groupe, n=32 rats par étude) recevant l'isotope radioactif libre, ou la molécule d'intérêt à 3 doses distinctes. Sur 5 ans, nous estimons donc le nombre d'animaux à n=160 rats sains et n=160 rats porteurs de tumeurs. La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, en comparaison avec une étude de bio-distribution classique qui nécessite l'euthanasie des animaux à chaque point de temps examiné, l'imagerie nous permet de répéter l'imagerie à différents temps et donc de réduire le nombre d'animaux d'autant. L'étude préalable des molécules d'intérêt sur culture cellulaire permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée. Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injection intraveineuse et imagerie) est réalisée sous anesthésie suivie d'un réveil sous lampe chauffante réduit l'inconfort potentiel à son minimum.

6906. Pour faire face au déclin du stock d'anguilles européennes, un règlement européen pour la reconstitution de l'espèce a été adopté. Parmi ces mesures, des opérations de « repeuplement » font chaque année l'objet d'un appel à projet national d'environ 2 millions d'euros et permettant de déverser environ 3 tonnes de civelles. L'objectif à terme de notre projet est d'apporter des éléments permettant de réduire le déficit de connaissances en comparant la survie des civelles « naturelles » (ayant subi le moins de manipulations possibles) et « repeuplées » (ayant subi le protocole classique : pêche professionnelle, transport, stabulation chez un mareyeur, marquage de masse) à la fois en milieu contrôlé et en milieu naturel. Afin d'atteindre cet objectif, il est nécessaire de disposer de méthodes de marquage externe des civelles. Notre étude consiste à tester la faisabilité d'un marquage externe, possiblement individuel, des civelles. La procédure, menée en milieu contrôlé (mésocosme) en 2016, consistera donc en une étude de faisabilité d'un marquage externe (microtag, VIE) utile pour une étude longitudinale sur de petits effectifs. Cela s'effectuera en implantant les marques retenues sous anesthésie à des civelles en évaluant le nombre de civelles pouvant être ainsi marquées par heure, la tenue des marques et un impact éventuel sur la croissance à court (24h), moyen (3 mois) et long terme (12 mois).

Avantages/dommages escomptés. Afin de limiter le stress engendré par la manipulation et de permettre un marquage confortable pour l'anguille et le manipulateur, une anesthésie sera systématiquement réalisée lors des opérations de biométrie et de marquage. La biométrie complète sur les civelles nécessite une euthanasie des individus. Le marquage externe, s'il s'avère concluant au terme de notre expérimentation, limitera le recours à une euthanasie dans les expérimentations futures et permettra une acquisition de données de meilleure qualité et sur un plus long terme en milieu naturel. Compte tenu des statuts vis-à-vis de la législation sur les maladies réglementées des lieux de prélèvement et de l'établissement, les individus seront euthanasiés en fin de procédure. Néanmoins les otolithes seront utilisés dans le cadre d'une étude sur les relations entre microchimie des otolithes et température. Nombre d'animaux. Les tests de puissance montrent que 240 individus par modalités (marqué VIE, marqué microtag, témoin) sont nécessaires auxquels s'ajoute 50 individus euthanasiés pour la caractérisation initiale des individus. Au total 770 individus seront donc utilisés. Conformité avec les trois principes. Remplacement : les procédures nécessitent l'utilisation d'organismes vivants

puisqu'elles font appel à la réponse des anguilles à l'insertion d'un corps étranger et à leur biologie (rétention des marques, diminution de la détection par pigmentation ou croissance, croissance). Réduction : le nombre d'individus a été choisi comme étant le minimum permettant de mettre en évidence les effets attendus (test de puissance). Par ailleurs le nombre de manipulation nécessitant une anesthésie des poissons est réduit au minimum. Raffinement : lors de chaque manipulation importante (biométrie ou marquage), les anguilles seront systématiquement anesthésiées. En mésocome, les anguilles seront alimentées et des caches leur seront fournies. Les densités seront limitées à un maximum de 500 civelles/m<sup>3</sup>.

6907. Les naissances issues de l'assistance médicale à la procréation représentent une part non négligeable des naissances totales (2.9% en France en 2013). Les recommandations actuelles de transfert d'un embryon unique pour réduire les risques associés aux grossesses multiples ont tendance à inciter à une "culture prolongée" permettant de mieux sélectionner l'embryon à réimplanter. Ainsi le recours à la culture prolongée a été multiplié par 2 en France en 4 ans (entre 2010 et 2013) pour atteindre 20 % des transferts d'embryons frais et 32 % des transferts d'embryons congelés. Aux Etats-Unis 50,4 % des transferts d'embryons frais ont lieu après culture prolongée (Bilan annuel SART 2013). La question de l'impact de la culture sur le développement de l'embryon est essentielle et reste très mal connue. Chez l'Homme, les résultats sont difficiles à interpréter et soumis à controverse car de nombreux paramètres, indépendants de la culture *in vitro*, peuvent influencer sur les résultats. L'utilisation de modèles animaux, permet de s'affranchir de certains de ces paramètres. Le choix du lapin comme modèle de l'embryon humain dans cette étude repose sur la constatation que l'embryon de lapin partage avec l'embryon humain des propriétés de métabolisme précoce qui autorisent l'utilisation de milieux de culture communs. Au-delà de ses caractéristiques métaboliques, sa cinétique de développement et son mode de placentation sont très proches de celles observées chez l'Homme. Le lapin est ainsi un modèle pertinent en vue d'une transposition des résultats à l'Homme. Nos recherches visent à caractériser l'impact de conditions de culture sur la capacité de développement *in vivo* de l'embryon. Dans cette étude, nous caractériserons les perturbations induites par la culture *in vitro* au niveau du métabolome, transcriptome et de l'épigénome des feuillettes embryonnaires de l'embryon de lapin transféré *in vivo*. Ces études nous permettront de déterminer la mise en place de la régulation de l'expression des gènes, de l'activation des voies fonctionnelles, étapes cruciales pour un développement embryonnaire correct. Ce projet portant sur le développement *in vivo* d'un embryon cultivé *in vitro*, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou *in silico*. Le nombre d'animaux impliqués dans chaque expérimentation a été réduit au maximum grâce aux techniques de superovulation maîtrisées chez cette espèce. Les protocoles d'analgésie et d'anesthésie pour la chirurgie réimplantatoire visent à réduire l'inconfort et le stress. Un suivi chirurgical et post-chirurgical permettra de mettre en place les traitements analgésiques, anti-inflammatoires et antibiotiques nécessaires. Les conditions d'hébergements seront enrichies par l'apport de foin (les animaux receveurs) et de balles en plastique, les cages sont équipées de mezzanine pour optimiser l'espace de vie. Le nombre de lapins impliqués dans ce projet a été calculé de façon à le réduire au maximum tout en restant compatible avec l'utilisation des tests statistiques non paramétriques permettant l'interprétation des résultats. Il sera de 855 animaux sur 5 ans.

6908. L'obésité est un problème majeur de santé publique car elle favorise le diabète ainsi que des maladies cardiovasculaires et hépatiques. Les maladies du foie fréquemment liées à l'obésité consistent en une accumulation de graisse (stéatose, ou « foie gras ») qui peut évoluer en lésions plus graves telles que la stéatohépatite (stéatose avec une nécroinflammation) et la cirrhose. Cette évolution défavorable peut être due à l'action de certaines protéines pro-inflammatoires et/ou à la présence d'un stress oxydant qui peut être en parti lié à l'induction d'une enzyme spécifique, le cytochrome P4502E1 (CYP2E1). Des études suggèrent que le risque de toxicité hépatique de certains médicaments tels que le paracétamol, un des médicaments antidouleurs le plus utilisé pourrait être plus important en cas de présence préalable de stéatose ou stéatohépatite. En effet, des investigations cliniques et expérimentales suggèrent que le foie gras est plus sensible à la toxicité du paracétamol en cas de surdosage. Un des mécanismes impliqués pourrait être l'augmentation de l'activité du CYP2E1 qui peut survenir lors de l'obésité. En effet, le CYP2E1 transforme le paracétamol en un métabolite très toxique. Cependant, aucune étude n'a été réalisée dans le contexte d'une administration de doses thérapeutiques de paracétamol (4g/jour). Pour déterminer si des doses thérapeutiques de paracétamol sont plus toxiques pour le foie dans un contexte de stéatose préexistante, nous prendrons comme modèle d'étude expérimental des souris obèses et non obèses. L'obésité sera induite par la consommation d'un régime riche en lipides. Le paracétamol sera administré dans l'eau de boisson. Ce projet nécessitera l'utilisation de 80 animaux répartis en différents groupes de traitements. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été réduit grâce à la réalisation d'une étude préliminaire et tests statistiques. De plus, le recours à des techniques *in vivo* d'imagerie et de spectroscopie par résonance magnétique, techniques non invasives et atraumatiques, pour quantifier les lipides hépatiques nous permettront d'effectuer un suivi longitudinal sur les mêmes animaux tout au long du projet, et de réduire leur nombre. Pour favoriser le bien-être des animaux, du matériel d'enrichissement (hutte et nid végétal) sera placé dans chaque cage. Un suivi quotidien des animaux sera mené sur toute la durée du projet pour déceler tout signe d'angoisse, de douleur ou de souffrance. Des paramètres comme l'activité physique/comportement, l'apparence du pelage et expression faciale seront utilisés comme critères particuliers de points limites. La mesure hebdomadaire de boisson et de nourriture sera également utilisée pour déceler tout état de souffrance. Afin de compléter cette étude expérimentale et remplacer l'usage ultérieur des animaux, des expérimentations *in vitro* seront effectuées sur une lignée hépatique humaine (HepaRG) pour déterminer les mécanismes impliqués dans l'induction du CYP2E1 hépatique au cours de la stéatose. Grâce à l'utilisation des hépatocytes humains traités ou non par des acides gras (AG), nous espérons identifier des AG favorisant l'activation du CYP2E1 hépatique et aboutir à des recommandations nutritionnelles faites aux sujets obèses afin de limiter non seulement l'apparition de la stéatohépatite, mais également empêcher l'hépatotoxicité de médicaments métabolisés par cette enzyme.

6909. La drépanocytose est une maladie génétique de l'hémoglobine, une protéine localisée dans les globules rouges, qui sert à transporter l'oxygène à travers le corps. La maladie se manifeste par une diminution des globules rouges (anémie), se traduisant par une fatigabilité, des vertiges, des essoufflements, une sensibilité aux infections et des crises douloureuses liées à une mauvaise circulation sanguine et un manque d'oxygénation des tissus. La drépanocytose est particulièrement fréquente dans les populations d'origine africaine, antillaise et méditerranéenne. En France, la prévalence est en moyenne de 1 sur 3000 naissances. Chez l'adulte, l'hémoglobine « A » est constituée de quatre molécules (2 chaînes alpha et 2 chaînes beta). En cas de drépanocytose, les chaînes beta sont anormales et l'hémoglobine, appelée alors hémoglobine « S » va « s'agglomérer » dans les globules rouges qui prennent alors la forme d'une faucille ou d'un croissant. Ces globules rouges falciformes, plus fragiles et plus rigides circulent mal dans les vaisseaux et n'assurent plus leur rôle de transporteur d'oxygène. Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif de la maladie, mais il est possible de soulager les douleurs en période de crise, de prendre en charge les complications (rénal, respiratoire... et de prévenir au mieux les infections graves grâce à un traitement médicamenteux (antibiotiques, anti-inflammatoires, antalgiques Hydroxyurée, transfusion...). Pour tenter de traiter la maladie durablement, la greffe de moelle osseuse est proposée dans les cas les plus graves mais cette approche n'est pas sans risque vital avec la possibilité de rejet du greffon contre l'hôte. Au vu des succès de thérapie génique dans certaines pathologies, la correction du gène de l'hémoglobine dans les cellules souches pourrait être une alternative à l'allogreffe. Le procédé de transfert de gène *ex vivo* consiste à réaliser un prélèvement de cellules provenant de moelle osseuse ou de sang périphérique mobilisé, suivi d'une sélection de cellules progénitrices CD34+. Ces cellules CD34+ sont ensuite activées en présence de cytokines, puis transduites avec un vecteur lentiviral portant une séquence codant pour le gène normal de la globine. Ces cellules transduites sont ensuite récoltées, lavées et ré-administrées par voie intraveineuse aux patients. Un vecteur lentiviral (HIV) sécurisé et de grade clinique a donc été développé pour réaliser une approche de thérapie génique hématopoïétique *ex vivo* pour les patients atteints de drépanocytose. Cependant, avant d'évaluer l'efficacité de ce vecteur de nouvelle génération en clinique, il est nécessaire de réaliser une étude *in vivo* visant à évaluer :

- La sécurité liée à l'administration de cellules souches hématopoïétiques génétiquement corrigées par un vecteur LV,
- La prise de greffe suffisante des cellules transduites,
- et la correction phénotypique de la maladie.

En effet, l'intégration aléatoire du provirus dans les progéniteurs hématopoïétiques peut entraîner un risque d'évènement de mutagenèse insertionnelle qui peut se traduire par le développement de tumeur (leucémie, lymphome...). Le projet consiste donc à valider l'absence de génotoxicité d'une production de grade "pré-clinique" de ce vecteur dans un protocole de souris humanisées. Les souris humanisées sont des souris reconstituées par des cellules hématopoïétiques humaines et permettent d'obtenir des modèles biologiques pour l'étude de cellules humaines *in vivo*. Ce modèle consiste à injecter des cellules CD34+ humaines par voie intraveineuse dans des souris NSG (NOD-SCID-gc-déficiente) irradiées (aplasie médullaire radio-induite). Les cellules humaines se développent au cours de temps chez l'animal et colonisent les organes hématopoïétiques de la souris à des degrés divers sur plusieurs semaines (pour une reconstitution optimale généralement entre 12 et 16 semaines post-injection). Ce modèle murin a été mis en place par une équipe de recherche en 2002 et est maintenant largement commercialisée. Dans le cadre de notre projet, ce modèle va nous permettre d'évaluer la biosécurité du vecteur par l'analyse des sites d'insertion dans les cellules humaines ayant colonisées la souris et qui sont à l'origine de la restauration hématologique après irradiation des animaux greffés. L'apparition éventuelle de signes pathologiques (tumeur) sera également évaluée. Bien que des études *in vitro* aient été réalisées sur cellules murines et humaines pour analyser les sites potentiels d'insertion du vecteur, il est nécessaire de réaliser également une étude *in vivo* afin de corrélérer la présence du vecteur et l'absence de toxicité. Le projet comporte l'analyse de 30 animaux au total. Des études préliminaires nous ont permis de déterminer la quantité de cellules CD34+ optimales à transplanter en fonction de leur provenance (sang de cordon, cytophère ou moelle osseuse) car la qualité souche des cellules CD34+ est variable d'un tissu hématopoïétique à l'autre et de valider la dose d'irradiation pour une prise de greffe adéquate. Ce protocole d'irradiation n'est pas létale et ne génère ni douleur, ni angoisse pour l'animal, il permet juste de faire de la place dans la moelle pour une recolonisation de cellules hématopoïétiques. Toutefois, des points limites seront identifiés et une surveillance des animaux sera opérée afin de vérifier que le bien-être des animaux est optimal.

6910. Plusieurs milliers de femmes en France n'ont pas ou plus d'utérus suite à une malformation congénitale, une chirurgie pour cancer pelvien ou pour geste d'hémostase après un accouchement. Pour ces femmes désireuses d'une grossesse, la transplantation utérine à partir de donneur vivant peut être une piste thérapeutique. Cette intervention a récemment permis la naissance de 5 enfants en Suède sur les 9 greffes réalisées. Mais des limites techniques demeurent, en particulier celles portant sur la dissection des vaisseaux utérins, qui nécessitent de longues interventions avec une mise en danger de la vie du donneur. Afin d'améliorer le protocole d'intervention, des recherches sont conduites sur un modèle animal. La brebis apparaît comme le modèle le plus pertinent de par sa taille et la vascularisation utérine similaire à celle de la femme. L'auto-transplantation d'un utérus ovin est considérée comme un modèle pour préparer la greffe chez l'Homme. Le but de notre étude, qui sera menée sur 5 brebis, est d'améliorer les approches chirurgicales afin de raccourcir la durée opératoire et de diminuer la morbidité. Les brebis seront maintenues dans l'unité expérimentale (bergerie), en conditions traditionnelles et en groupes jusqu'à la veille de l'intervention chirurgicale. L'environnement sera enrichi avec des pierres de sel. Le soir précédant l'opération, les brebis concernées seront mis à jeun dans une case individuelle, à proximité visuelle et olfactive des autres individus. Le jour de l'opération, avant l'anesthésie, les brebis recevront un traitement anti-douleur pour éviter toute souffrance. Les animaux seront euthanasiés à l'issue de l'intervention chirurgicale sans avoir été réveillés. Au-delà des aspects traitant de la durée opératoire pour ce protocole d'autogreffe, l'effectif d'animaux que nous utiliserons est suffisant pour l'évaluation des complications en post-opératoire qui sera réalisée en utilisant des techniques d'imagerie non invasive de type échographie-doppler 3D. La qualité fonctionnelle du greffon sera évaluée au décours de la greffe par l'analyse de



marqueurs cliniques (coloration de l'utérus, perméabilité des connexions entre vaisseaux sanguins, absence d'hématome) juste avant l'euthanasie.

6911. L'ensemble de ce projet a déjà été validé. Seules les procédures 4 et 5 présentent des amendements mineurs au projet. L'objectif général de nos expériences est de comprendre comment le cerveau guide et contrôle les mouvements des yeux. Afin d'atteindre cet objectif, les activités électriques de neurones dans le cerveau de singes macaques, entraînés à produire des mouvements des yeux pour suivre des stimuli visuels, seront enregistrés et perturbés. Les mouvements seront ensuite analysés en utilisant des modèles mathématiques de réseaux de neurones. Comprendre comment le cerveau guide les mouvements des yeux chez le primate non-humain doit permettre d'offrir une meilleure compréhension du fonctionnement du cerveau chez l'homme sain et ainsi de développer des outils de diagnostic plus efficaces dans l'avancée des traitements des lésions cérébrales et/ou des maladies neurologiques chez de nombreux patients. Des données convergentes de la littérature scientifique suggèrent que la régulation du comportement est réalisée grâce à la coordination entre des réseaux cortico-corticaux et cortico-sous-corticaux du contrôle inhibiteur de la réponse. La dérégulation sévère de réseaux est de fait impliquée dans un grand nombre de pathologie psychiatriques ou neuro-dégénératives. Toutefois, une compréhension des bases neurales sous-jacentes à ces observations manquent, ralentissant ainsi l'intervention thérapeutique sur ces réseaux neuronaux. Le présent projet de tester l'hypothèse originale selon laquelle les structures inhibitrices cérébrales sont organisées selon une hiérarchie rigoureuse, similaire à celle (mieux décrites) des structures activatrices. D'un point de vue expérimental, nous effectuerons des enregistrements électrophysiologiques de façon à caractériser le degré d'implication des aires d'intérêt dans le contrôle inhibiteur des mouvements oculaires, et ce en fonction du comportement en cours. Nous nous focaliserons sur le contrôle inhibiteur des mouvements oculaires chez le primate non-humain - macaque Rhésus ou *fascicularis* dans chacune de ces régions corticales et sous-corticales. Au total 10 animaux seront nécessaires pour mener à bien ces études. Afin de réduire à 10 le nombre d'animaux, plusieurs animaux pourront participer à plusieurs protocoles notamment les protocoles non-invasifs (stimulation ultrasonores, et d'imagerie fonctionnelle). L'utilisation de modèles mathématiques nous permettra également de tester de nouvelles hypothèses avant d'avoir recours à la validation expérimentale et/ou à perfectionner ces modèles prédictifs. Les retombées de ce projet sont doubles. 1. Au niveau physiologique, cette étude devrait révéler les mécanismes intimes impliqués dans le contrôle intégré des processus inhibiteurs réalisés dans les aires cérébrales ciblées, et permettre ainsi de dégager des réseaux cortico-sous corticaux véhiculant ces fonctions inhibitrices spécifiques. 2. Au niveau clinique, nos investigations pharmacologiques devraient améliorer notre compréhension des troubles résultant de déficits inhibiteurs et suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des patients chez lesquels les déficits inhibiteurs sont responsables d'une part importante de la symptomatologie. Pour toute intervention chirurgicale, le singe est tranquilisé dans sa cage. L'animal est ensuite profondément anesthésié (respiration assistée). Un analgésique est systématiquement administré si la procédure peut induire une douleur transitoire chez l'animal.

6912. L'épilepsie est l'affection neurologique la plus fréquente après la migraine. Elle touche 1% de la population française et constitue un problème de santé publique majeur. Parmi ces épilepsies, 60% sont focales, c'est à dire qu'une activité hyper synchrone anormale, typique de l'épilepsie, n'est présente que dans une région bien délimitée du cerveau. Ces épilepsies focales s'accompagnent de troubles moteurs, cognitifs ou émotifs, récurrents et très invalidants pour les patients, avec un retentissement social et sur l'autonomie de ces patients. En dépit de nombreuses avancées thérapeutiques, 30% de ces épilepsies sont pharmaco-résistantes (60 à 80 000 patients en France) et parmi elles seules 30 % sont opérables. Le seul traitement chirurgical disponible à l'heure actuelle consiste à réséquer le foyer épileptogène, et n'est envisageable que s'il se situe dans une zone non éloquent du cortex, ce qui n'est pas le cas des épilepsies préfrontales pour lesquelles il est donc urgent de trouver des alternatives thérapeutiques. Durant ces 10 dernières années, différentes stratégies thérapeutiques ont été testées pour ces épilepsies résistantes. La stimulation cérébrale profonde a donné des résultats encourageants, cette technique est réversible, peu invasive et est, de plus, bien maîtrisée à l'heure actuelle. En effet, la stimulation cérébrale profonde du noyau subthalamique a fait ses preuves dans la maladie de Parkinson et récemment des patients parkinsoniens ont aussi été implantés avec succès au niveau de noyau pédonculopontin pour améliorer leur trouble de la marche. Il se trouve que le noyau pédonculopontin petite structure située dans le tronc cérébral qui a un rôle clef à jouer dans l'induction et le maintien de la désynchronisation corticale, qui correspond à une activité électrique de cerveau associé à l'éveil et qui disparaît pendant une crise d'épilepsie pour être remplacé par une hypersynchronisation corticale. De nombreuses observations chez le patient épileptique montrent, en effet, que le noyau pédonculopontin ne serait pas suffisamment actif chez ces patients ce qui faciliterait la survenue des crises d'épilepsie. Ainsi, on peut s'attendre à ce que son activation par la stimulation cérébrale profonde permette de maintenir la désynchronisation corticale et donc de diminuer, voire d'empêcher, la survenue des crises d'épilepsie. Nous nous proposons donc d'évaluer l'effet de l'activation par stimulation cérébrale profonde du noyau pédonculopontin chez un modèle primate de crise d'épilepsie préfrontale transitoire induites par injection *in situ* d'un agent épileptogène. L'injection de cet agent engendrera la survenue des crises pendant 4 à 5 heures, période au cours de laquelle on pourra tester l'effet thérapeutique de la stimulation cérébrale profonde du noyau pédonculopontin. L'effet transitoire de cet agent nous permettra de répéter l'expérience plusieurs fois chez le même animal et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Un test statistique a permis de déterminer qu'au total 8 animaux seront nécessaires pour obtenir des résultats suffisamment clairs pour permettre de les transposer aux patients. En effet, cette étude constituera une étape préclinique dans laquelle, l'équipement électro-stimulateur, destiné au patient, sera implanté ce qui nécessite l'utilisation d'un modèle animal ayant une taille suffisante pour être équipé de ce système avec une neuroanatomie proche de celle du patient. De sorte qu'il nous est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Enfin, le projet implique la mise en place d'un état pathologique chez le primate avec de la chirurgie de classe modérée. A ce titre, et en vue du raffinement de l'étude, une attention

particulière sera portée l'état de santé des animaux tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

6913. L'objet de cette demande d'autorisation de projet est d'établir une lignée de souris doublement déficientes pour les gènes STARD3 et Niemann Pick C (NPC1) et d'étudier le phénotype dommageable de ces animaux. La mutation du gène Niemann Pick C (NPC1) chez l'Homme conduit à une maladie génétique grave et incurable caractérisée par l'altération des systèmes nerveux et hépatiques, conduisant le plus souvent au décès des patients dès l'enfance. Il existe un modèle de cette maladie chez la souris : les souris déficientes pour le gène NPC1 qui développent des symptômes proches de ceux de la maladie humaine et qui en meurent jeunes. Les symptômes de la maladie NPC1 sont une accumulation de lipides dans plusieurs organes comme le foie et la rate. La grande similarité entre ce modèle de souris et la pathologie humaine en fait un modèle idéal pour l'étude de cette maladie et pour tester des médicaments pour soigner la maladie, mais aussi pour tester des raisonnements scientifiques permettant de comprendre la maladie et son évolution, ce qui rend le REMPLACEMENT par une méthode alternative inutile à notre stade. L'utilisation de ce modèle est rependue dans le monde de la recherche, l'accès aux études publiées permet de REDUIRE le nombre des animaux et de raffiner le protocole. Des recherches antérieures ont montré que le gène NPC1 permet l'élimination des lipides par les cellules. En son absence les lipides s'accumulent dans les cellules et détériorent l'organisme. Au laboratoire nous avons découvert une protéine STARD3 dont le rôle est à l'inverse de retenir les lipides dans les cellules. Ainsi il est envisageable de pouvoir corriger la maladie NPC en éliminant STARD3. Dans le but de REMPLACER l'utilisation des souris nous avons fait un ensemble d'expériences préliminaires sur des cellules de malades NPC1 qui confortent notre hypothèse et montrent qu'il existe un lien fonctionnel entre les gènes NPC1 et STARD3. Il est nécessaire de valider l'hypothèse à un niveau supérieur par le croisement des souris malades NPC1 avec les souris déficientes pour STARD3 (viables et fertiles sans phénotype apparent) et le suivi du phénotype. Pour cela nous croiserons les animaux des 2 lignées pour obtenir les 30 souris mutantes nécessaires à l'étude. Ainsi, ce projet a pour but de mieux comprendre la maladie de Niemann Pick de type C en étudiant un modèle murin de cette pathologie et en particulier le rôle du gène STARD3 dans le phénotype. RAFFINEMENT : Nous nous attendons ainsi à un phénotype dommageable chez les animaux à naître. Afin d'éviter toute souffrance inutile, les animaux feront l'objet d'un suivi rapproché et des points limites éthique sont définis.

6914. Il est maintenant bien démontré que les cellules du système immunitaire et notamment les leucocytes (globules blancs) présents dans le microenvironnement tumoral jouent un rôle majeur dans l'évolution de la tumeur et sa réponse aux traitements. Cette observation conduit à développer des stratégies thérapeutiques ciblant les cellules du système immunitaire afin de stimuler leur activité et de renforcer l'efficacité des traitements conventionnels tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie.

En utilisant 2 modèles précliniques (cancer du col de l'utérus et fibrosarcome), le but de cette étude et :

1/ de combiner un traitement par radiothérapie (irradiation localisée sur la tumeur) avec des anticorps monoclonaux permettant de renforcer l'activité anti-tumorale des cellules du système immunitaire.

2/ de comparer l'efficacité d'un traitement par radiothérapie (irradiation localisée sur la tumeur) chez des souris déficientes ou non pour l'expression de la molécule CD39.

La progression tumorale sera évaluée en comparant les valeurs de masse tumorale au cours du temps. La significativité des différences de croissance tumorale sera déterminée par un test statistique. Les souris seront surveillées quotidiennement ceci dans le but de :

- suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 20% du poids normal de l'animal,

- détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal (exigence de raffinement).

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir un résultat statistiquement significatif (exigence de réduction). Les expériences seront réalisées avec 8 animaux par groupe et seront reproduite 1 fois, afin de tester la reproductibilité.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre maximal de 1224 souris sur une durée de 5 ans. Dans le souci de respecter la règle de 3R, s'il n'y a aucune ambiguïté sur les résultats nous éviterons les répétitions inutiles. On anticipe donc que le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera inférieur au nombre total annoncé.

6915. 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, lorsqu'elle est administrée chez le chien anesthésié. Pour ce faire, la pression artérielle et l'électrocardiogramme seront mesurés et enregistrés en continu pendant toute la durée de l'expérience (avant administration du candidat médicament, pendant et après administration). En plus des paramètres cardiovasculaires, l'anesthésie sera monitorée avec mesure des gaz du sang et de la saturation en oxygène.

Des prélèvements sanguins seront réalisés régulièrement pendant l'expérience pour évaluer l'exposition des animaux à la substance administrée et/ou à ses métabolites. Le nombre estimé de chiens est de 4 par étude, pour 5 études par an, soit un maximum de 100 chiens sur 5 ans. 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 (expérience *in vitro*) pour étudier l'effet d'un candidat-médicament sur la fonction cardiovasculaire des animaux. Or avant tout 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 effectué 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 peu invasives
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

6916. La myopathie de Duchenne est une maladie génétique qui touche la musculature chez l'enfant, provoquant une faiblesse musculaire généralisée et évolutive. Les patients sont contraints à l'usage du fauteuil roulant vers l'âge de 10 ans, et décèdent d'insuffisance respiratoire ou cardiaque vers l'âge de 30 ans. Il n'existe pas, à ce jour, de solution curative pour la myopathie de Duchenne. Il existe différents modèles de cette maladie pour travailler sur l'élaboration des médicaments, des modèles *in vitro* (cultures cellulaires de muscle) aux modèles animaux. Toutefois, seul le contexte du chien atteint spontanément par cette même maladie, le chien GRMD (golden retriever muscular dystrophy), reproduit de manière fidèle les manifestations cliniques humaines. Lorsqu'un médicament a fait ses preuves sur des modèles *in vitro* puis dans le modèle murin, et qu'il a des chances réelles d'arriver au chevet du patient, la prédiction de son intérêt chez l'homme sera d'autant plus forte qu'un essai favorable a été réalisé chez le chien. La validité de cette projection de résultats du chien vers l'homme est liée à l'excellente valeur translationnelle des données précliniques obtenues dans l'espèce canine. C'est le cas du riméporide, molécule qui sera testée dans ce projet. Cette molécule est un inhibiteur d'un échangeur sodium-proton qui a montré des effets très positifs sur des muscles en culture (modèles *in vitro*) : diminution du pH (anormalement élevé dans les muscles des malades), et régulation des influx de sodium et de calcium (dérégulés chez les malades). Chez la souris myopathe et le hamster souffrant de cardiomyopathie, des effets positifs respectivement sur la fonction musculaire et cardiaque ont été identifiés, mais ils doivent être confirmés dans un contexte pathologique proche du contexte humain, tel que celui du chien GRMD. Notre projet a pour objectif d'étudier l'effet du riméporide administré chroniquement (plusieurs mois), soit à un stade précoce de la maladie afin d'étudier son effet préventif, soit à un stade plus avancé afin d'étudier son effet curatif. L'objectif est de déterminer si un traitement par cette molécule serait plus efficace chez des patients jeunes encore ambulants (<10 ans) ou sur des patients plus âgés, et de préciser la cible de cette molécule (muscle strié squelettique vs cardiaque). Ainsi, les résultats obtenus permettront d'orienter le positionnement de cette molécule en clinique (âge et organe ciblés). Dans une étude sur l'effet du riméporide administré précocement, un total de 20 chiens GRMD sera inclus. Parmi ces animaux, 10 recevront le traitement, à la dose de 20 mg/kg/j en deux prises quotidiennes, et 10 recevront un placebo, de l'âge de 2 mois (début des signes cliniques) à l'âge de 12 mois (maladie bien installée). Il s'agira d'une étude en double aveugle. Dans un souci de réduction, cet effectif d'animaux a été optimisé pour permettre d'identifier, s'il existe, un effet majeur qui, seul, pourrait motiver le passage en clinique. Le second volet de l'étude porte sur les effets du riméporide administré tardivement et a déjà fait l'objet d'une autorisation de projet pour 6 chiens GRMD, traités de l'âge de 12 mois à l'âge de 18 mois. Ce protocole est en cours de réalisation et quelques effets prometteurs observés sur ces animaux nous poussent à demander l'autorisation de prolonger leur traitement jusqu'à l'âge de 24 mois, afin de documenter ces effets sur le plus long terme, étant précisé que ces animaux sont dans un état clinique très satisfaisant, et que, dans un souci de réduction, les données obtenues seront comparées à nos données déjà disponibles sur des chiens non traités, évitant ainsi l'inclusion d'un groupe placebo. Des tests fonctionnels (tests locomoteurs, respiratoires, cardiaques, imagerie RMN) seront réalisés de manière itérative dans les deux études afin de suivre au plus près l'évolution clinique des animaux. Dans un souci de raffinement, les méthodes d'évaluation utilisées sont, autant que possible, des méthodes cliniques et non-invasives : à titre d'exemple l'imagerie par RMN permet de limiter le recours à la biopsie musculaire chirurgicale, tout en offrant une information plus complète que celle procurée par un simple échantillon. A l'issue de chacune des deux études, les chiens seront euthanasiés et différents échantillons de tissus seront prélevés. Le chien GRMD est un modèle de myopathie de Duchenne incontournable au stade préclinique pour obtenir des réponses que des modèles *in vitro* ne peuvent pas fournir. L'utilisation de ces animaux requiert une expertise dans leur maintien, des soins spécifiques qui leur sont nécessaires pour leur permettre de vivre dans les meilleures conditions possibles, tout en ayant défini des points limites précis et suffisamment précoces pour éviter à ces chiens toute souffrance prolongée et inutile.

6917. Le Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) est un agent infectieux entraînant une maladie ressemblant à la fièvre aphteuse (lésions vésiculaires), chez les bovidés, les chevaux et les porcs. Elle peut être transmise à d'autre espèce dont l'homme, où elle provoque un syndrome grippal sans mortalité. Il est par contre avéré que le VSV peut infecter les souris et entraîner une infection systémique jusqu'à provoquer une encéphalite fatale, c'est pourquoi la souris est un excellent modèle pour étudier la pathogénicité. Notre projet est d'étudier le rôle de la dimérisation de la phosphoprotéine P du virus dans la multiplication du virus. La protéine P est essentielle aux étapes de transcription et réplication du virus et il a été proposé que la protéine P est active sous forme dimérique. Afin de tester cette hypothèse, un virus recombinant dépourvu de ce domaine de P a été généré. Le virus (VSV Mutant) obtenu est parfaitement viable et ne présente aucune différence dans sa capacité de se multiplier dans différents types de cellules en culture, comparé au virus sauvage (VSV WT). Ce résultat indique que la protéine P monomérique est fonctionnelle. Le fait que ce domaine soit conservé au cours de l'évolution implique que ce domaine a une fonction durant le cycle viral. Etant donné que les études préalables faites en culture présentent des limites, nous avons recours à l'expérimentation animale pour explorer le rôle de la dimérisation de P dans une autre fonction potentielle de la protéine P en lien avec la pathogénicité du virus en souris. Dans ce projet, un maximum de 368 souris (consanguines, afin de réduire la variabilité interindividuelle et donc le nombre total d'individus) sera utilisé. Après répartition en groupes comparables, elles seront inoculées par voie intranasale avec le virus. Le VSV infecte les neurones olfactifs de la muqueuse nasale puis pénètre dans le système nerveux central par les nerfs olfactifs. Le virus est ensuite disséminé dans les autres régions du cerveau grâce à un transport au travers du réseau de neurones, responsable de l'infection aigue du cerveau. Les souris développent de façon plus ou moins importante des signes d'infection virale (fourrure hérissée, perte de

pois, réduction des activités, paralysie, voire décès). Le nombre de souris utilisé sera réduit au minimum indispensable tout en permettant des observations statistiques acceptables, avec un maximum de 368 (lorsque nous sommes amenés à renouveler 1 fois l'expérience pour obtenir un effectif compatible avec des tests statistiques plus robustes). Les souris auront par ailleurs un accès illimité à la nourriture et la boisson, dans des cages avec litière changée régulièrement et présence d'enrichissement (tubes de plastique creux). Les souris seront traitées par des antalgiques à titre préventif pendant la durée de l'infection. Elles seront surveillées régulièrement pour détecter tout signe de mauvaise tolérance. Si un des points limites (agitation, agressivité ou à l'inverse prostration et/ou troubles évidents de la mobilité et perte de poids trop importante) est observé, les souris seront euthanasiées.

6918. L'équipe a un intérêt de longue date dans la compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant le développement du système nerveux en utilisant l'embryon de poisson zèbre comme modèle. Nous utilisons un ensemble complémentaire de stratégies génétiques, moléculaires et d'imagerie pour notamment comprendre comment les facteurs de transcription proneuraux coordonnent la neurogenèse et la morphogenèse de la placode olfactive en développement, comment les cascades de signalisation intercellulaire interagissent pour spécifier différents sous-types de neurones dans la glande pinéale, et comment les asymétries gauche/droite sont mise en place dans le cerveau. Le poisson zèbre est un modèle reconnu et validé pour l'étude du développement embryonnaire. Il est notamment un modèle permettant la génétique, c'est-à-dire la génération de lignées transgéniques ou mutantes stables. Grâce à cela, les analyses sur les effets de pertes et de gains de fonctions des activités géniques sont possibles. De plus, l'embryon étant transparent, le poisson zèbre est un modèle de choix pour les analyses du développement dite « *in vivo* » par imagerie à haute résolution. Nos recherches fondamentales visent à étudier les mécanismes impliqués dans le développement embryonnaire en particulier lors de la mise en place du système nerveux central et de fait, se réalisent sur des embryons âgés de moins de 5 jours. Nous portons une attention particulière à la réduction du nombre de poissons hébergés au laboratoire ainsi que des embryons utilisés pour l'expérimentation et veillons donc à faire évoluer nos techniques expérimentales en conséquence. Ainsi, nous prévoyons de générer et d'utiliser 798 animaux pour ce projet. Les poissons adultes sont conservés à des fins purement reproductives. Bien que n'utilisant pas de protocoles invasifs, nous nous appliquons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des poissons au maximum et veillons au bien-être de nos animaux en suivant quotidiennement les signes visibles d'un animal souffrant et en procédant si nécessaire à une euthanasie.

6919. Les protéases jouent un rôle décisif en santé humaine, ont une sécrétion augmentée dans la lumière digestive où elles participent à de nombreux troubles gastro-intestinaux tels que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ou le syndrome de l'intestin irritable (SII). Elles activent une famille de récepteurs PAR (pour protease activated receptor) comprenant 4 membres et qui sont tous exprimés dans l'épithélium ou la muqueuse intestinale, induisant de nombreux types de réponses biologiques comme une hypersensibilité viscérale, une potentialisation des réactions inflammatoires et de la perméabilité de l'épithélium. Dans ce processus, les fonctions de PAR1, PAR2 et PAR4 ont bien été caractérisées alors que celles de PAR3 (le 4ème membre de cette famille) restent inconnues. Nous avons récemment observé qu'il est fortement exprimé dans l'intestin et est sensible à plusieurs protéases, suggérant qu'il participe aussi activement à la physiopathologie du tube digestif. L'objet de notre étude est donc de caractériser cette fonction de PAR3 dans la physiopathologie digestive chez la souris (560 animaux seront nécessaires) puisque les régulations des sensibilités à la douleur et aux inflammations requièrent obligatoirement des animaux vivants où l'innervation et les systèmes sanguins et immunitaires sont opérationnels. Nous mesurerons les sensibilités à la douleur, au stress et aux inflammations chez des souris exprimant ou n'exprimant pas le récepteur. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, nous nous sommes attachés dans ce protocole à utiliser un nombre restreint d'animaux. Le but final est de préciser les stratégies thérapeutiques utilisant des molécules inhibant les protéases intestinales, dont l'utilisation pharmacologique semble très prometteuse, il ne nous est pas possible d'éviter l'utilisation du modèle intégré *in-vivo*. Les animaux seront hébergés dans les meilleures conditions répondant aux plus hauts standards de bien-être animal.

6920. Le Trouble de Stress Post-traumatique (TSPT) est un état de détresse psychologique qui survient au décours d'un événement traumatique. Il se manifeste par des reviviscences (cauchemars, flash-backs) qui surviennent de manière spontanée ou provoquée par des éléments/ repères présents lors de l'évènement et qui y sont associés. Les traitements proposés ont une efficacité très limitée, c'est pourquoi la recherche clinique et fondamentale s'intéresse à un traitement innovant du TSPT : le propranolol. Ce bêtabloquant a montré son efficacité sur le TSPT en diminuant l'intensité émotionnelle du souvenir traumatique quand il est administré ponctuellement après la réactivation du souvenir traumatique. En effet, un souvenir peut être réactivé par différents repères (odeur, bruit...) et dans différents lieux (familier ou non) et après sa réactivation, le souvenir devient labile et peut être modifié ou effacé sous l'effet du propranolol (mécanisme d'inhibition de reconsolidation). Le mécanisme d'action du propranolol est encore inconnu et pour comprendre son efficacité, nous allons mener chez l'animal une étude fondamentale dans des conditions similaires à celles rencontrées chez les patients TSPT. Aucun modèle non-animal ne peut être utilisé pour cette étude.

Chez l'animal, les tests comportementaux actuellement utilisés pour étudier le TSPT ne sont pas adaptés et il nous a semblé important de développer un nouveau test comportemental mimant le plus possible ce qui se passe chez le patient TSPT. Ce dispositif est composé de 4 compartiments reliés par un compartiment central. Les animaux sont familiarisés à ce dispositif afin qu'ils connaissent parfaitement l'ensemble des compartiments. Puis, les animaux seront conditionnés selon une procédure d'apprentissage pavlovien classique dans l'un de ces compartiments connus, très riche contextuellement car quatre repères (visuel, olfactif, auditif et tactile) y ont été ajoutés. 24h plus tard une réactivation de la mémoire est effectuée en plaçant l'animal soit dans le dispositif connu, soit dans un environnement complètement nouveau en présence de 2 ou 4 repères associés aux chocs. Le lendemain, les animaux sont replacés

dans le dispositif où les 4 repères associés aux chocs ont été préalablement placés deux par deux dans deux des compartiments du dispositif. Pour mesurer la mémoire traumatique, nous mesurons l'évitement du compartiment choc mais également des compartiments familiers qui ont maintenant deux repères associés aux chocs. Le premier objectif de cette étude est de rechercher l'action générale du propranolol sur la reconsolidation mnésique d'une information acquise dans une situation stressante. Nous utiliserons le nouveau test comportemental et les animaux auront une injection de propranolol lors d'une séance de réactivation partielle. Il sera étudié chez les animaux témoins, si deux des repères placés dans un contexte familier peuvent rappeler l'ensemble de la situation aversive et quels sont les repères les plus importants (visuel, auditif, olfactif, tactile) dans ce type d'association. Chez les animaux avec injection de propranolol, l'efficacité du traitement sur le souvenir traumatique réactivé sera étudiée, permettant de connaître quelle est la meilleure réactivation qui induit avec le propranolol, le plus grand oubli de la situation traumatique. Chez l'animal, il est difficile de valider la présence de reviviscences telles que le rapportent les patients TSPT. Cependant, lors de ces reviviscences chez l'homme, une augmentation importante de la fréquence cardiaque est observée. Le deuxième objectif de cette étude est donc de mesurer chez la souris les reviviscences spontanées dans un contexte aversif ou non en utilisant ces modifications du rythme cardiaque. Pour cela, nous implanterons des capteurs sous la peau des souris pouvant enregistrer par télémetrie l'activité cardiaque des souris en continu. Ces souris seront placées dans le nouveau test comportemental pour savoir si elles réalisent des reviviscences spontanées ou si des repères associés à l'événement traumatique provoquent ces reviviscences détectées par l'augmentation de la fréquence cardiaque. Ce projet, avec ces différentes étapes, nécessite l'utilisation maximale de 298 souris. Le nombre d'animaux utilisés dans le projet est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Quand cela est possible, les différentes parties du projet sont regroupées pour réduire le nombre de groupes observés. Enfin, des mesures antalgiques seront mises en œuvre autant que nécessaire et des points limite seront appliqués si besoin.

Cette étude permettra de mieux comprendre les effets du propranolol sur les reviviscences spontanées ou provoquées, et donc d'améliorer le protocole thérapeutique des patients TSPT.

6921. Les biomédicaments sont des thérapies ciblées dirigées vers l'inhibition d'acteurs cellulaires ou moléculaires impliqués dans la physiopathologie des maladies. Les traitements anti-TNF $\alpha$  font partie de cette catégorie. Les anti-TNF- $\alpha$  ont révolutionné la prise en charge de maladies comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), les spondyloarthrites, le psoriasis ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin. Les études d'efficacité rapportent qu'environ 60 à 70% des patients répondent à ce traitement. L'administration des biomédicaments peut induire une réponse du système immunitaire qui produit des anticorps anti biomédicament. On parle d'immunisation anti biomédicament. Il a été démontré que ces anticorps accélèrent l'élimination des biomédicaments par l'organisme participant à la perte d'efficacité. Ainsi, diminuer l'immunisation anti biomédicament pourrait améliorer leur efficacité. Il existe des données dans la littérature scientifique montrant que la co-prescription de traitement immuno-modulateur (le méthotrexate (MTX) notamment) avec les biomédicaments pourrait permettre de réduire l'immunisation anti médicament et ainsi d'augmenter l'efficacité des traitements. L'objectif primaire de ce projet est d'étudier l'effet du MTX dans la prévention de l'immunisation anti-biomédicament. Cette action doit passer par un effet tolérisateur du MTX qui expliquerait également son mode d'action en tant qu'immuno-modulateur, mode d'action mal compris à l'heure actuelle. Ainsi, l'objectif secondaire sera l'étude du mode d'action du MTX au cours des maladies auto-immunes. De telles études nécessitant l'analyse des phénomènes dans plusieurs types d'organes et plusieurs types cellulaires et ne peuvent, en conséquence, qu'être réalisées que sur des organismes entiers. Le modèle animal est donc nécessaire pour réunir le maximum d'informations permettant de comprendre ces mécanismes aboutissant aux complications des traitements chez les patients. Le modèle animal retenu pour ce projet est la souris. En effet, l'utilisation de biomédicaments humanisés s'associe à un taux d'immunisation proche de 100% chez la souris, ce qui en fait un modèle idéal pour l'étude de la prévention de ce phénomène. De plus, notre équipe a déjà obtenu des résultats préliminaires intéressants sur l'effet positif du MTX pour l'obtention de la tolérisation dans un modèle murin spécifique mimant la PR dans ses manifestations cliniques, biologiques et immunologiques. Nos données préliminaires ont permis d'affiner au maximum le nombre d'animaux nécessaire par groupe pour un effectif maximal de 6 souris/groupe tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non-paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Par ailleurs, nous allons d'abord mettre en place une étude pilote afin de vérifier si les observations sont identiques chez des souris sauvages et chez nos souris Tg (données préliminaires). Cette étude pilote permettra donc de diviser par 2 le nombre de groupes expérimentaux en cas de confirmation des résultats chez les souris sauvage. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administrations et prélèvements sous anesthésie, limitations des volumes de sang prélevés). La durée de la phase de traitement sera réduite au minimum (8 semaines) alors que l'ensemble des analyses biochimiques et immunologiques s'étalera sur 4 ans. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 124 animaux provenant d'élevages autorisés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires des traitements). Dans ce cas, des traitements appropriés seront mis en œuvre. A terme ce travail pourrait avoir des retombées importantes afin de prévenir le problème de l'immunisation anti biomédicament mais également dans l'optimisation des traitements immuno-modulateurs au cours des maladies auto-immunes.

6922. Contexte. La leucémie est un cancer caractérisé par la prolifération excessive et le blocage de la différenciation des cellules immatures du sang, localisées dans la moelle osseuse. Selon la cellule d'origine à partir de laquelle la maladie se développe et selon la vitesse de ce processus, on peut distinguer les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et myéloblastiques (LAM) et les leucémies chroniques lymphoïdes (LLC) et myéloïdes (LMC). Parmi les LAL, on distingue les LAL-B des LAL-T selon que les progéniteurs affectés soient des progéniteurs lymphoïdes B ou T. Au niveau moléculaire, cette maladie résulte de mutations qui

activent des oncogènes ou inactivent des gènes suppresseurs de tumeur, à travers des mécanismes qui, aujourd'hui, ne sont pas encore complètement compris. Les leucémies affectent enfants et adultes, et malgré le fait que dans les dernières années beaucoup de progrès ont été fait du point de vue thérapeutique, des rechutes fatales sont observées dans 20 % des cas pédiatriques et 50% des LAL-T de l'adulte. Il est donc essentiel de poursuivre la dissection des mécanismes moléculaires conduisant à ces pathologies pour concevoir des thérapies ciblées pouvant améliorer la survie des patients leucémiques. Résumé de la recherche. Notre laboratoire a montré qu'une voie de signalisation est activée de façon soutenue dans les LAL-/lymphomes T humains et dans des modèles murins de ces pathologies et que cette voie est essentielle au maintien à long terme de ces leucémies. Plusieurs partenaires de cette voie de signalisation ont été identifiés qui jouent un rôle important dans la leucémie. Nos modèles de co-cultures (Remplacement) ont permis d'identifier certaines cibles de ces voies de signalisation dont nous souhaitons maintenant valider l'importance *in vivo* (Réduction des cibles par les tests *in vitro*). Nous avons généré des lignées traçables *in vivo* (utilisation de la luminescence) qui permettent d'utiliser moins d'animaux (2900 souris) et de façons moins invasives pour évaluer l'évolution des pathologies *in vivo* (Raffinement).

6923. MitoNEET est une petite protéine de la membrane externe de la mitochondrie contenant un cofacteur fer-soufre nécessaire à sa fonction. Bien que MitoNEET ait été identifiée comme la cible moléculaire de la Pioglitazone, un composé présentant des propriétés anti-diabétiques et neuroprotectrices, son rôle dans la cellule reste encore peu connu et appelle à de plus amples investigations. Dans une précédente étude, il a été mis en évidence que MitoNEET pouvait jouer un rôle dans la réparation des centres fer-soufre dans des cellules en culture. Il est apparu que mitoNEET pouvait interagir avec un régulateur du métabolisme du fer, notamment en condition de stress. MitoNEET pourrait donc constituer un lien entre la mitochondrie et le métabolisme du fer, et participer à la récupération cellulaire après un stress. Cette hypothèse reste encore à confirmer dans des conditions physiologiques. Pour cela, des souris seront injectées avec un vecteur viral qui aura pour rôle de diminuer l'expression de mitoNEET. Dans ce projet, nous évaluerons l'efficacité de plusieurs vecteurs viraux en condition physiologique normale. Différents organes issus des souris injectées seront prélevés et analysés en histologie et en biologie moléculaire. REMPLACEMENT : Les vecteurs viraux ont été étudiés autant que possible *in vitro*. Il reste néanmoins impossible de se passer d'un organisme complexe pour étudier l'effet cellulaire et moléculaire de nos vecteurs dans un contexte physiologique.

REDUCTION : 204 souris au maximum seront nécessaires pour subvenir aux besoins expérimentaux et pour obtenir une puissance statistique permettant de conclure sur les résultats. Le projet se divise en plusieurs étapes successives qui permettront de réévaluer à la baisse le nombre de souris nécessaires. En effet, certains groupes d'animaux ne seront pas utilisés si un vecteur viral s'avère peu efficace à l'issue des premières analyses.

RAFFINEMENT : Les injections se feront sous anesthésie générale et les animaux seront observés jusqu'à leur réveil complet. Les conséquences de la diminution de l'expression de MitoNEET sont peu connues, nous porterons une attention particulière au bien-être des animaux tout au long des expériences.

6924. Le lait est produit dans la glande mammaire par les cellules épithéliales mammaires. La production de lait d'une vache dépend de l'activité mais aussi du nombre de cellules dans la glande mammaire. Le nombre de cellules dans la mamelle est en perpétuel renouvellement du fait de la mort des cellules et de leur multiplication. De plus, une partie des cellules mammaires est évacuée dans le lait. L'évolution de la production laitière dépendrait donc en partie de la quantité de cellules évacuées dans le lait. Nous avons développé une méthode innovante pour isoler les cellules mammaires du lait afin d'étudier leur fonctionnalité et leur perte dans le lait. Nous ne connaissons pas l'effet du niveau alimentaire sur la perte de cellules mammaires dans le lait et la répercussion sur le nombre de cellules dans la mamelle. La connaissance des mécanismes qui régulent la perte de cellules mammaires dans le lait permettrait de définir des conduites d'élevage limitant cette perte et ou de caractériser les animaux selon ce critère dans un but de sélectionner génétiquement des animaux qui conservent un maximum de cellules dans le tissu. Ceci permettrait d'allonger la durée des lactations, ce qui réduirait le temps non productif des animaux tout en limitant les périodes de risques pour la santé et la reproduction des femelles (début de lactation). Cela pourrait également stabiliser la production de lait annuelle en termes de quantité et de composition, ce qui serait un atout pour la filière de transformation du lait. Un essai sera conduit sur 20 vaches laitières en milieu de lactation. Les animaux seront séparés en deux groupes expérimentaux qui seront alimentés soit avec un haut niveau, soit avec un bas niveau d'apport alimentaire pendant 4 semaines. Des prélèvements de lait, de sangs et des biopsies mammaires permettront d'étudier l'évolution du nombre de cellules dans la mamelle.

Remplacement : il n'est pas possible de réaliser cette étude autrement que sur vaches en lactation.

Réduction : le nombre d'animaux a été calculé en fonction du traitement statistique choisi et adapté au schéma expérimental. Nous avons privilégié les prélèvements sur le lait (méthode non invasive d'étude des cellules mammaires)

Raffinement : la conduite d'élevage sera une conduite classique respectueuse du bien-être des animaux. Chaque procédure de prélèvement d'échantillons biologiques sera accompagnée par une procédure analgésique et anesthésique adaptée et un suivi du comportement des animaux.

6925. La résistance aux bêta-lactamines parmi les entérobactéries et *Pseudomonas spp* a considérablement augmenté et pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Cette résistance est due à l'émergence d'enzymes capables de les hydrolyser, les bêta-lactamases et principalement des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les bêta-lactamases, les carbapénémases sont les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ces carbapénémases conduisent ainsi à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes considérés comme des traitements de dernier recours. La stratégie la plus

efficace pour restaurer l'activité des bêta-lactamines est de les associer à un inhibiteur de bêta-lactamases (IBL). Le céfépime est une céphalosporine de quatrième génération à large spectre, qui montre une activité bactéricide sur les bactéries à la fois à Gram positif et Gram négatif. En revanche, cette molécule est inactive sur des souches productrices de bêta-lactamases. En association avec le céfépime, un nouvel inhibiteur de bêta-lactamase serait capable de restaurer son activité vis-à-vis des bactéries multirésistantes. Le but de notre travail est d'évaluer l'activité de l'association céfépime/nouvel IBL dans deux modèles murins expérimentaux, péritonite et infection de cuisse, et de comparer cette activité au céfépime seul. Quatre souches bactériennes de phénotypes de résistance différents seront évaluées dans ce projet. Pour la première partie de l'étude, pour chaque souche, deux paramètres seront déterminés : la dose létale 100 et la dose efficace 50 (pour chaque souche et pour chaque antibiotique (céfépime et céfépime/IBL)). Pour la dose létale 100, trois inocula par souche seront testés soit 72 souris pour ce paramètre. Pour évaluer la dose efficace 50, les animaux infectés seront répartis en 13 groupes : un groupe témoin, 6 groupes traités avec le céfépime (6 posologies) et 6 groupes traités avec le céfépime en association avec l'IBL (6 posologies) soit 312 souris au total. Afin de mener à bien cette première partie de l'étude, 384 souris Swiss femelles vont donc être utilisées.

Pour la deuxième partie de l'étude, la greffe bactérienne sera dans un premier temps validée. Puis, après avoir induit une infection de la cuisse chez des souris neutropéniques, 3 groupes seront traités avec un antibiotique (1 groupe correspondant à un schéma thérapeutique : céfépime seul ou en association avec l'IBL (2 posologies)) et 2 groupes ne recevront pas de traitement (animaux témoins). Quarante-huit heures après l'infection, les animaux seront euthanasiés et le quadriceps de la cuisse droite et celui de la cuisse gauche seront prélevés afin de déterminer les charges bactériennes. 36 souris Swiss femelles par souche vont ainsi être utilisées soit un total de 144 pour ce modèle. Au total, pour ce projet, 528 souris SWISS seront utilisées. Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*). Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

6926. Chez l'Homme, la maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones produisant de la dopamine situés dans une région du cerveau, appelée la substance noire. La dopamine est un neurotransmetteur essentiel pour le contrôle des mouvements volontaires et les apprentissages. Elle est produite à partir d'une molécule simple, un acide aminé, la tyrosine qui est d'abord transformée dans le cerveau L-DOPA puis en dopamine. La conversion de la LDOPA en dopamine se fait grâce à une enzyme appelée l'AADC. Le seul moyen actuel de soigner la maladie de Parkinson n'est pas curatif, il consiste à donner aux malades de la L-DOPA pour compenser son absence de dopamine. Cela permet de traiter efficacement pendant un certain temps les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Malheureusement, ce traitement chronique finit par provoquer l'apparition de complications motrices sévères sous forme de mouvements involontaires anormaux appelés dyskinésie qui contrecarre le gain procuré par la L-DOPA et diminue beaucoup la qualité de vie des patients. De nouvelles voies thérapeutiques sont donc activement recherchées. Une de ces voies est de travailler sur l'hypothèse que plusieurs données suggèrent : la L-DOPA pourrait être un neurotransmetteur et aurait des effets indépendants de sa conversion en dopamine. Pour tester cette hypothèse, dans ce projet, nous proposons de bloquer la synthèse de l'enzyme AADC dans les neurones dopaminergiques de la substance noire chez le rat afin qu'ils ne produisent plus de dopamine mais seulement de la L-DOPA. Notre stratégie expérimentale sera donc de rapporter par une chirurgie stéréotaxique la molécule capable de bloquer la synthèse de l'enzyme AADC dans la substance noire de rat puis après récupération, d'évaluer le comportement moteur des animaux. L'analyse des neurones dopamine sera faite sur le cerveau des animaux prélevés après leur mise à mort. L'analyse des effets sur le comportement moteur nous contraint à utiliser des animaux. Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, la validation des molécules capables de bloquer la synthèse de l'AADC a été réalisée *in vitro* (cellules en cultures PC12). De plus, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 32 rats incluant les groupes expérimentaux et leur contrôle. Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée actuelle n'indique que l'inactivation de l'AADC soit susceptible d'entraîner une souffrance chez les animaux, toutes les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées par les molécules les plus adaptées. Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement spontané de l'animal avec une légère contention. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

6927. Ce projet vise au développement d'un système d'assistance peropératoire pour les opérations de la thyroïde. Les glandes parathyroïdes qui régulent la calcémie chez l'homme doivent être préservées lors des opérations de la thyroïde afin d'éviter des complications post-opératoires. En éclairant la thyroïde avec une longueur d'onde du rouge profond, on observe une autofluorescence des glandes parathyroïdes dans le proche IR permettant de nettement les discriminer au sein de la thyroïde. Cependant, un certain nombre de faux positifs viennent perturber cette imagerie, dus notamment aux graisses brunes ou à des nodules cancéreux. Un premier objectif de l'étude est d'identifier des longueurs d'ondes très spécifiques d'émission d'autofluorescence des différents composants permettant de discriminer les glandes parathyroïdes tout en éliminant les sources de faux positifs. Un second objectif sera d'arriver à discriminer ce signal de parathyroïde qui peut être enfoui jusqu'à 3mm sous les tissus. Le projet s'articulera en 3 phases et celle qui concerne la demande d'autorisation d'expérimentation animale est la suivante :

Analyse par spectrométrie de réflectance diffuse de tissus thyroïdaux de cochon excités par un laser dans le proche IR afin de déterminer les longueurs d'ondes les plus spécifiques à cet usage et construire une géométrie d'acquisition adaptée aux profondeurs de localisation. Ce projet se réalisera donc sur des porcelets Landras de 3 mois, d'environ 50 kgs provenant d'un élevage. Le nombre estimé de porcelets qui sera nécessaire à ce projet est de 10 pour 5 ans.

La règle des 3 R ne concerne que la phase de l'intervention chirurgicale :

Remplacer : Nous n'avons pas les moyens techniques à ce jour pour effectuer ce projet *ex vivo* ou *in silico* car cette étude doit être faite dans un environnement physiologique intégré.

Réduire : Nous utiliserons un minimum de 2 porcelets et un max de 10 en fonction du nombre de séances nécessaires pour cette étude.

Raffinement : Les porcelets sont traités dans les mêmes conditions que les patients humains. Nous prenons en compte le stress et la douleur. Ils seront opérés sous anesthésie générale avec une analgésie adaptée. C'est une procédure sans réveil.

6928. Des patients atteints de pathologies graves et rares telles que les déficits immunitaires primitifs ("bébé bulle") ou acquis et les hémophilies (déficiences en facteur de la coagulation), ainsi que les patients en soins intensifs, sont traités avec des médicaments purifiés à partir du plasma humain. Comme tout médicament, ces produits (immunoglobulines polyvalentes, facteurs de coagulation et albumine) peuvent présenter certains effets adverses. Un de ces effets est l'hypotension artérielle dont la cause n'est pas clairement identifiée et qui peut mettre en péril la survie des patients.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le pouvoir hypotensif de ces médicaments. Cette évaluation s'effectue dans le cadre du traitement d'écarts de production susceptibles d'impacter la sécurité du lot (action hypotensive non souhaitée). Les essais sont réalisés dans un cadre réglementaire et les résultats participent à la décision de libérer un lot sur le marché. Des essais peuvent être aussi réalisés dans le cadre du développement de nouveaux produits/procédés de purification, pour évaluer si certaines protéines co-purifiées peuvent avoir un impact sur la pression artérielle. Aucun dispositif *in vitro* ou modèle informatique permettant cette évaluation n'existe actuellement : le recours à des modèles animaux est inévitable. Le pouvoir hypotensif est évalué par la mesure de la pression artérielle avant et après injection par voie intraveineuse du médicament chez le rongeur. L'opération est effectuée sous anesthésie générale afin d'éviter les souffrances de l'animal. La pression artérielle est mesurée à l'aide d'un capteur placé au niveau de la carotide de l'animal et relié à l'appareil enregistreur. Les méthodes non invasives de mesure de pression artérielle ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter l'effet hypotenseur des protéines humaines chez l'animal.

Une étude de ce type demande 12 rongeurs pour tester un produit. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour garantir la validité des résultats. Avec une estimation de 10 études par an, cela représente 120 rongeurs sur une année et 600 rongeurs sur 5 ans. Tous les animaux utilisés sont nés et élevés dans des établissements agréés. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

6929. Ce projet concerne la prise de décision et la capacité d'un sujet à adapter ses actions en fonction de leurs conséquences. Au sein du cortex préfrontal médian, les interneurons à parvalbumine (PV) doivent jouer un rôle important dans la flexibilité comportementale. La compréhension du rôle des neurones PV dans la prise de décision est un enjeu essentiel, ces neurones présentant notamment des altérations dans des pathologies neuropsychiatriques telles que la Schizophrénie. Les processus de base de sélection d'une action peuvent être étudiés non seulement chez le Primate ou l'Humain, mais également chez un rongeur tel que la Souris, ce qui permet des manipulations spécifiques du fonctionnement cérébral. Ce projet vise à clarifier la participation des interneurons PV à l'acquisition d'une réponse dirigée et à l'adaptation des changements de stratégie comportementale. A cette fin, les interneurons de type PV seront éliminés de manière permanente ou bien inhibés ou activés de manière temporaire chez la Souris au cours d'une tâche de flexibilité comportementale. Une première expérience utilisera des souris issues d'un croisement entre deux souches transgéniques, ce qui fournit un moyen de choix pour éliminer de manière très spécifique et locale les interneurons PV dans le cortex préfrontal. Après récupération, les souris devront apprendre une tâche d'appui sur des leviers en situation de restriction alimentaire légère, puis adapter leur comportement lorsque la nourriture est distribuée de manière aléatoire (dégradation de contingence). Une seconde série d'expériences utilisera une seule de ces souches de souris transgéniques, qui recevront un vecteur viral non infectieux et non toxique (AAV). Pendant ou après l'entraînement, les animaux recevront une injection journalière (intrapéritonéale) d'un agent pharmacologique neutre (CNO) qui inhibe ou excite les neurones de manière réversible par action sur les neurones transfectés. Le projet nécessite une phase de validation des procédures comportementales de manière non invasive sur des souris intactes et des vérifications histologiques et électrophysiologiques de l'effet des injections sur des tranches de cerveau *in vitro*. S'agissant d'études comportementales impliquant des processus cérébraux de haut niveau, le recours à l'animal entier est indispensable et ne peut être remplacé. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et l'invasivité des procédures (démarche 3R), ce projet s'appuie sur une approche neurocomputationnelle et des procédures comportementales fortement standardisées. Le raffinement des procédures inclut l'emploi d'animaux transgéniques qui permettent de n'effectuer qu'une seule injection intracérébrale. De plus, la douleur éventuelle est prise en compte par des critères objectifs décrits dans les paragraphes 3.3.5 et 3.4.13 et l'observation des animaux. Compte tenu des nécessités de puissance statistique et d'homogénéité des groupes utilisés, le nombre total d'animaux nécessaires est évalué à 230. Les souris seront élevées au laboratoire à partir d'un petit nombre de progéniteurs génétiquement modifiés au phénotype non dommageable.

6930. La maladie de Parkinson est la deuxième des maladies neurodégénératives les plus fréquentes. Malgré cela, les causes sont encore mal connues. Dans les dernières années, nombreuses études indiquent que l'accumulation de la forme toxique de la protéine alpha-synucléine serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques et des problèmes moteurs conséquents. De plus, des études récentes suggèrent que l'alpha-synucléine « toxique » peut être transmise de cellule à cellule par l'espace extracellulaire. Le but de notre projet est d'étudier la contribution de l'espace extracellulaire, et de son échafaudage, la matrice extracellulaire, à la propagation de l'alpha-synucléine et par conséquent, à l'origine de la maladie. Pour répondre à cette question, nous utiliserons un



modèle murin de la maladie de Parkinson basé sur la propagation de l'alpha-synucléine mal conformée, où nous explorerons l'espace extracellulaire du cerveau en employant de nouvelles techniques d'imagerie : (i) Des nanotubes fluorescents de carbone pour le sondage de l'espace extracellulaire ; (ii) de la microscopie électronique sur tissu cryo-fixé pour son analyse volumétrique et (iii) de la reconstruction en 3D par ordinateur de la matrice extracellulaire. Ces approches permettront de composer, à une échelle nanométrique, une carte de l'espace extracellulaire et de sa matrice dans les régions d'intérêt. En analysant la relation entre cette carte et les neurones dopaminergiques, ce projet apportera des données sur les mécanismes de propagation de l'alpha-synucléine qui contribueront à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la maladie. L'étude des conséquences de la propagation de l'alpha-synucléine dans le cerveau ne peut être comprise pour l'heure avec des approches *in vitro* et nécessite donc l'utilisation d'animaux. Dans le respect du R de réduire, il est prévu un échantillonnage de 3 ou 6 animaux/groupe traité ou contrôle, pour pouvoir conduire en parallèle les expériences d'imagerie et d'électrophysiologie et avoir un échantillonnage statistique suffisant. Il faut un total de 72 animaux pour la réalisation de ce projet. Dans le respect du R de raffiner de la règle des 3R, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie stéréotaxique nécessaire pour apporter l'alpha-synucléine mal conformée, seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Des points limites suffisamment prédictifs seront définis pour réduire la souffrance tout au long de la vie de l'animal.

6931. L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'effet anti-tumoral de l'association d'un médicament couramment utilisé en cardiologie (la Trinitrine ou GTN) avec une chimiothérapie de référence dans les cancers du côlon métastatiques (le FOLFOX). Le but est de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de cet effet antitumoral et le rôle joué par les cellules immunitaires. L'intérêt de cette étude est grand, puisqu'il a été observé que la trinitrine permettait une meilleure longévité de personnes atteintes de cancer du poumon et traitées par chimiothérapie. La compréhension des mécanismes mis en place suite au double traitement dans le développement tumoral ouvrirait donc les portes à l'utilisation de nouvelles thérapies en oncologie. Nous analyserons le rôle de la trinitrine associée au FOLFOX dans la progression des tumeurs sous-cutanées et le développement de métastases pulmonaires mimant différents stades tumoraux, en utilisant des cellules murines du colon CT26. L'implication des cellules immunitaires sera mise en évidence par utilisation de souris déficientes dans certaines populations du système immunitaire. L'identification plus précise de ces cellules sera alors réalisée par analyse du contenu des tumeurs.

Pour cette étude, 100 souris Balb/c, 40 souris nues (déficientes en lymphocytes T) et 40 souris NOD-SCID gamma (déficientes en lymphocytes T et cellules NK) seront utilisées pour suivre la progression de tumeurs sous-cutanées, 60 autres souris Balb/c seront utilisées pour le suivi des métastases pulmonaires. Ces souris seront réparties par groupes de 5 individus nous permettant d'obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs comme nous l'ont démontrées des études précédentes. La lignée de cellules tumorale de souris CT26 sera injectée par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse dans les différentes souris. Les expériences de suivi de la progression tumorale seront réalisées 2 fois, celles permettant l'identification de la nature des cellules immunitaires seront réalisées 3 fois pour permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. La croissance des tumeurs sous-cutanées sera évaluée par mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse, les souris seront mises à mort 25 jours après injection des cellules tumorales, ou lors de signes de souffrance ou lorsque le volume tumoral atteint 1500 mm<sup>3</sup>. La croissance des métastases pulmonaires sera évaluée après l'euthanasie des souris 15 jours après injection des cellules tumorales, l'expérience du laboratoire montrant qu'à ce stade le développement tumoral n'induit pas de douleurs. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces possible afin d'éviter toute souffrance des animaux. Le test statistique Mann-Whitney et l'expérience du laboratoire nous ont permis de réduire les groupes d'animaux à 5 individus par groupe et de ne devoir répéter que deux fois les expériences pour la progression tumorale et 3 fois pour le phénotypage. Ces expériences réalisées dans les cellules tumorales en culture ne permettent pas de mettre en évidence un effet de la combinaison trinitrine/FOLFOX alors qu'une étude préliminaire a montré un fort effet anti-tumoral chez la souris, nécessitant donc l'utilisation de la souris pour permettre l'étude des mécanismes induits par cette association et l'utilisation future chez l'Homme.

6932. L'objectif de cette étude est de comprendre l'influence de la protéine cIAP1 (cellular Inhibitor of Apoptosis) sur la croissance des tumeurs. En effet, cette protéine se retrouve très fortement exprimée dans de très nombreux types de cancers humains, mais à ce jour, ses fonctions exactes dans le contexte cancéreux demeurent mal comprises. Nous analyserons et tenterons d'expliquer l'importance de cIAP1 associée ou non à son partenaire cIAP2 dans la progression de tumeurs sous-cutanées et le développement de métastases pulmonaires mimant différents stades tumoraux, en utilisant des mutants (8 mutants) de cette protéine dont les fonctions dans les différentes voies de signalisation sont en cours d'étude dans des cellules cancéreuses. L'intérêt de cette étude est grand, puisque des inhibiteurs des IAP sont en actuellement en essais cliniques chez l'homme. La compréhension des mécanismes mis en place par cIAP1 dans le développement tumoral ouvrirait donc les portes à l'utilisation de nouveaux traitements en oncologie. Pour cette étude, 190 souris seront utilisées pour suivre la progression de tumeurs sous-cutanées et 190 autres souris seront utilisées pour le suivi des métastases pulmonaires. Ces souris seront réparties par groupes de 5 individus nous permettant d'obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs comme nous l'ont démontrées nos études précédentes. Une lignée de cellules tumorale de souris déficiente en cIAP1 exprimant cIAP1 ou différents mutants de la protéine (8 mutants) sera injectée par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse dans une souris nue. L'importance des homo-dimères cIAP1/cIAP1 sera analysée dans une lignée de cellules tumorales déficientes en cIAP1 et cIAP2 et exprimant cIAP1 ou différents mutants de la protéine. Toutes les expériences seront réalisées 2 fois. La croissance des tumeurs sous-cutanées sera évaluée par mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse, les souris seront mises à mort lors de signes de souffrance ou lorsque le volume tumoral atteint 1200 mm<sup>3</sup>. La croissance des métastases pulmonaires sera évaluée par imagerie métabolique (TEP/IRM) et les animaux seront euthanasiés 20 jours après l'injection des cellules tumorales (cinétique déjà connue) ou avant si pour certains mutants la quantité de nodules pulmonaires

est beaucoup trop importante. Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces possible afin d'éviter toute souffrance des animaux. L'utilisation des souris pour l'étude de cette protéine a déjà été faite et a permis de comprendre des phénomènes également démontrés chez l'humain, il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des animaux plus proches de l'homme. Afin de s'assurer du caractère tumoral des cellules utilisées, de nombreuses études ont été réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires. L'étude *in vivo* permettra de vérifier nos hypothèses et d'observer l'impact sur la croissance tumorale.

6933. A l'heure actuelle, on pense que les troubles autistiques sont dus en partie à des facteurs génétiques mais il reste encore à les caractériser et à préciser leurs rôles. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés à ces troubles du comportement, l'étude chez l'animal est indispensable. Dans ce domaine la création de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène impliquée dans l'autisme chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche. Ces dernières années, un gène candidat qui est associé à l'autisme chez l'homme a été identifié : le gène Shank3. Ce projet vise à créer une lignée de souris dont le gène Shank3 sera excisé. Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou biomoléculaire au comportement. Beaucoup d'études « *in-vitro* » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation. Raffiner : Les animaux seront hébergés en cage collective de 4 à 8 animaux enrichie avec un nid végétal. Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 et 6 trios de souris (1 mâles et 2 femelles) seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Ensuite, pour maintenir la lignée, seulement 2 trios (1 mâles et 2 femelles) seront hébergés en continu. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 185 animaux.

6934. La tétralogie de Fallot est une pathologie cardiaque congénitale fréquente représentant à elle seule plus de 10% des cardiopathies congénitales. Les anomalies cardiaques caractéristiques de la tétralogie de Fallot sont le plus souvent corrigées chirurgicalement à un très jeune âge, permettant aux patients de vivre dans de bonnes conditions pendant de nombreuses années. Cependant à l'âge adulte, ces patients présentent des dysfonctions ventriculaires droites (contraction inefficace) très souvent accompagnées de troubles du rythme sévères et de mort subite pour lesquels un traitement bien défini n'existe pas encore. Le remplacement de la valve pulmonaire par une prothèse est souvent nécessaire chez ces patients pour limiter la dysfonction du ventricule droit mais le timing optimal pour effectuer cette intervention reste débattu et les conséquences sur l'activité électrique du cœur méconnues. Ce projet a pour but de caractériser l'électrophysiologie ventriculaire lors de la dysfonction ventriculaire droite faisant suite à la tétralogie de Fallot opérée et d'étudier la réversibilité de ces anomalies après le remplacement de la valve pulmonaire. Nous identifierons les mécanismes arythmogènes dans cette situation pathologique grâce à une approche intégrative de l'animal *in vivo*, en passant par le cœur explanté, les cardiomyocytes isolés et jusqu'aux mécanismes moléculaires. La caractérisation des mécanismes arythmogènes dans la dysfonction ventriculaire droite permettra d'identifier des cibles thérapeutiques de choix. Ce projet sera développé autour d'un modèle chronique de dysfonction ventriculaire droite chez le porcelet qui mime les lésions d'une tétralogie de Fallot opérée (24 animaux au total). Cette espèce, de par la proximité de son anatomie et de son électrophysiologie cardiaque avec celles de l'Homme, facilitera la translation des résultats à la clinique. Cet aspect translationnel ne serait pas retrouvé chez le rongeur chez qui l'anatomie et l'électrophysiologie cardiaque diffèrent et qui complexifierait grandement la mise en œuvre de notre projet au niveau chirurgical et de l'exploration *in vivo* des animaux.

Afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires et ne peuvent être remplacés actuellement mais c'est une volonté de travailler sur le remplacement d'études *in-vivo*. Bien que les données obtenues à partir de ces études ne peuvent pas être obtenues à partir d'études informatiques, elles pourront à terme être incorporées à des modèles numériques et participer ainsi au remplacement et à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans de prochaines études. Dans le cadre du projet, pour réduire le nombre d'animaux, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux. Les mesures de raffinements mises en place sur notre site concernent leur prise en charge à l'arrivée (période d'acclimatation, hébergement collectif, enrichissement spécifique...) ainsi que leur inclusion dans la procédure. Des points limites seront par ailleurs appliqués si nécessaire. Toutes ces mesures sont détaillées dans le document.

6935. La chirurgie de résection pulmonaire (pneumectomie ou PN) est une intervention lourde grevée d'une morbi-mortalité importante à court et long terme. L'indication la plus fréquente est la chirurgie curative du cancer du poumon non métastatique. Chez l'homme, le pronostic post-opératoire est lié au patient (âge, tabac, maladies associées), et au volume de poumon réséqué. La PN droite est l'intervention la plus à risque car le poumon droit a le volume le plus important. Les complications post-opératoires sont principalement d'ordre pulmonaire et cardiovasculaire et diminuent la survie du patient. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est la principale complication. Les mécanismes de l'HTAP après PN sont multiples et intriqués 1) Défaillance respiratoire liée à la respiration sur un seul poumon 2) Elévation des résistances vasculaires pulmonaires et du débit sanguin dans le poumon restant 3) Prolifération de cellules dans les vaisseaux du poumon restant, en réponse à l'agression. Le cœur droit défaille lorsque sa « pression de sortie » (Pression artérielle pulmonaire, ou PAP) augmente et s'oppose à son éjection. En l'état actuel des connaissances, nous ne disposons d'aucun traitement permettant de prévenir ces complications. Notre hypothèse est que le pré-conditionnement (PC) pourrait prévenir ces complications. Le PC correspond à de courtes périodes d'interruption de la perfusion d'un organe. Chez l'animal comme chez l'homme, les effets bénéfiques du PC ont déjà été montrés pour d'autres organes mais le PC pulmonaire n'a jamais été étudié. Il consiste en une interruption intermittente de la perfusion du poumon droit, de façon à «

habituer » le poumon gauche à fonctionner seul, et à « habituer » le cœur droit à fonctionner sur un seul poumon. Aujourd'hui, aucune alternative basée sur l'utilisation de méthodes *in vitro* ne peut mimer les atteintes observées après PN *in vivo*, d'où la nécessité d'utiliser un modèle animal. La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de rats adultes Sprague Dawley (nombre estimé : 48 animaux). Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données. Nous réaliserons sur les mêmes animaux des investigations *in vivo* et *ex vivo*. Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, et pour apprécier au mieux les points limites.

6936. Le présent protocole s'inscrit dans un projet ayant pour objectif le développement de composés actifs pour la prévention et le traitement de l'obésité sarcopénique. Il n'a pas encore été mis au point de traitement efficace contre cette pathologie.

La sarcopénie est une pathologie qui touche principalement les personnes âgées ou en arrêt d'activité motrice et se caractérise par une perte accélérée de la masse et donc de la force musculaire. Chez les personnes âgées en surpoids, les cellules musculaires peuvent être infiltrées par des cellules adipeuses favorisant ainsi l'accumulation de lipides dans le muscle et la perte de fonctionnalité des muscles. On parle alors d'obésité sarcopénique. La 20-hydroxyecdysone est une phytoecdysone (famille de stéroïdes extraits de plantes). Cette molécule semble limiter l'accumulation de la masse grasse et renforcer la masse maigre par un mécanisme partiellement décrit, impliquant probablement une limitation de la captation des acides gras dans le tissu adipeux, une augmentation de l'oxydation des acides gras dans le muscle et une stimulation de la synthèse protéique musculaire. Ces propriétés de la 20-hydroxyecdysone (appelée ici 20E ou BIO101) permettent d'envisager son utilisation, ainsi que l'utilisation d'un de ses dérivés (BIO103) en tant que médicaments susceptibles de prévenir l'établissement ou l'aggravation de l'obésité sarcopénique. Nous étudierons 70 souris au total, car il n'est pas possible de réaliser cette étude sur des cellules. Leur nombre a été calculé au plus juste en fonction de l'analyse statistique. Le milieu dans lequel est élevé les souris est enrichi et toutes les mesures sont prises afin d'éviter leur souffrance. Il n'est pas possible de mimer l'effet d'une molécule sur la morphologie des muscles au niveau cellulaire *in vitro*, ce qui oblige de réaliser notre étude chez l'animal entier. Nous étudierons 70 souris au total, car il n'est pas possible de réaliser cette étude sur des cellules. Leur nombre a été calculé au plus juste en fonction de l'analyse statistique. Le nombre est justifié par le fait qu'il faut un effectif suffisant dans chaque groupe afin qu'on puisse tester si des différences significatives existent entre les groupes, du fait de la variabilité attendue des paramètres mesurés. Nous avons fixé le nombre de souris à 10 par groupe, ce nombre a été déterminé lors de nos précédentes investigations. Il prend en compte la variabilité interindividuelle mais aussi le fait que nous testons des effets nutritionnels. Le comportement normal (toiletage, repos, alimentation dans la cage, interaction avec le congénère) et anormal (déplacement incessant lors de la phase diurne, immobilité) dans la cage et l'aspect visuel de la souris est évalué tous les jours par le personnel de l'animalerie. Les animaux sont pesés chaque semaine afin d'identifier une perte de poids corporelle. En cas de perte de poids importante (> 20%) la souris est euthanasiée. Le critère de perte de poids sera complété par l'observation du comportement des animaux. Une diminution de l'activité motrice et une faiblesse d'un animal entrainera sa sortie du protocole et son euthanasie. S'agissant de l'enrichissement, toutes les cages de cette étude seront garnies de cellulose (litière douce) avec une maisonnette en carton.

6937. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies neuromusculaires chez l'enfant. Elle est due à des mutations dans le gène de la dystrophine, une protéine jouant un rôle majeur dans la fonction et l'intégrité de la fibre musculaire. Notre équipe a montré une restauration efficace de la synthèse de dystrophine par saut de l'exon muté chez le modèle murin et canin de la maladie par expression de séquences antisens de l'exon muté via un petit ARN nucléaire dérivé du snRNA-U7. Cet U7 est exprimé dans le muscle via des vecteurs viraux AAV (AAV-U7) qui sont des vecteurs de thérapie génique dérivés du virus adéno-associé à l'adénovirus. Nos travaux ont également montré que les génomes viraux étaient perdus progressivement des muscles dystrophiques et que malheureusement une injection d'AAV-U7 thérapeutique induit une réponse immune qui bloque toute réitération de traitement. Alors que les essais cliniques utilisant le saut d'exon thérapeutique AAV-U7 pour les patients DMD sont en cours, il apparaît crucial d'étudier les conditions optimales d'efficacité de l'approche thérapeutique AAV-U7.

Le premier but du projet est de caractériser la perte des génomes AAV des muscles dystrophiques. Nous avons montré que les génomes thérapeutiques AAV sont perdus des muscles de souris mdx déficientes pour la dystrophine après une injection en intramusculaire d'AAV-U7. Nous proposons de décrire le destin des génomes AAV dans différents muscles de souris mdx après injection systémique d'AAV-U7.

Le deuxième but est de trouver des solutions pour empêcher la perte des génomes AAV des muscles dystrophiques. Nous avons montré qu'un prétraitement avec des oligonucléotides antisens PPMO qui induisent temporairement l'expression de la dystrophine au sarcolemme permet de maintenir les génomes viraux dans les fibres musculaires et d'augmenter la restauration de la dystrophine par AAV-U7 et AAV-microdystrophine. Nous proposons de poursuivre cette étude après injection systémique du prétraitement PPMO et de l'AAV-U7 ou AAV-microdystrophine sur la musculature entière de la souris mdx mais également de la souris dKO. Cette dernière est invalidée pour le gène de la dystrophine mais également celui de l'utrophine et présente un phénotype dystrophique sévère proche des symptômes des patients DMD.

Le nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet est de 270 souris dont 30 souris C57BL/6, 100 mdx et 140 dKO.

Les injections d'AAV et d'oligonucléotides n'engendrent pas de douleur. Les protocoles durent entre 3 semaines et 6 mois suivant l'objectif final avant euthanasie, à l'exception de la procédure n°5 pour l'évaluation de l'espérance de vie des souris dKO traitées, pour laquelle l'état des animaux sera évalué quotidiennement et en cas d'apparition d'un comportement anormal de l'animal (symptômes tels que des tremblements, paralysie, perte importante de poids...), celui-ci sera euthanasié.

Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton.

Notre stratégie d'expérimentation afin de réduire au minimum le nombre d'animaux est basée sur notre expérience dans le domaine qui nous a montré que pour assurer la validité statistique des résultats, les expérimentations *in vivo* peuvent être effectuées sur seulement 5 animaux par lot expérimental et l'expérience répétée 2 fois. Cela permet une analyse statistique par test de Student des résultats obtenus et de mettre en œuvre la suite des expériences sur des bases solides.

6938. Afin d'améliorer la durabilité de la production aquacole d'espèces carnivores (régime alimentaire est basé sur la consommation de chairs ou de tissus d'animaux vivants ou morts) comme les salmonidés, il est essentiel de réduire la part de farine de poisson, issue des pêches minotières, dans les aliments aquacoles. L'augmentation de la part de glucides digestibles dans l'aliment semble être une bonne option tant d'un point de vue économique qu'environnemental. Toutefois, la truite est considérée comme un carnivore strict, utilisant comme principale source d'énergie les protéines alimentaires et faiblement adaptée à l'utilisation des glucides. Les conséquences en sont que lorsque la farine de poisson est substituée à plus de 20% par les glucides digestibles, cette espèce présente des baisses de performance de croissance et une hyperglycémie (une concentration en sucre dans le sang anormalement élevée) postprandiale persistante, définissant cette espèce comme intolérante au glucose. Une stratégie permettant d'adapter les animaux à leur futur environnement nutritionnel, *i.e.* riche en glucides digestibles ici, repose sur la programmation nutritionnelle précoce par un stimulus strictement nutritionnel ou non. La programmation repose sur le fait qu'un stimulus appliqué durant une période de plasticité métabolique sera enregistré par l'organisme et agira sur son phénotype à venir (ensemble des caractères observables d'un individu) comme cela est bien décrit chez les mammifères durant la gestation ou chez les abeilles pour expliquer les différences entre les reines et les ouvrières. Afin de programmer le métabolisme glucidique (ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant liées à l'utilisation des glucides) chez la truite et améliorer son utilisation des glucides alimentaires, nous proposons ici l'application précoce d'un stimulus avant le premier repas donc forcément non nutritionnel (il a été prouvé précédemment qu'un seul stimulus nutritionnel lors de l'alimentation précoce n'est pas suffisant pour programmer ce métabolisme) : l'hypoxie (diminution de la quantité d'oxygène) combinée à un stimulus hyperglycémique lors de la nutrition précoce. Les conditions d'hypoxie appliquées sont modérées et n'affecte pas la survie ni la croissance des poissons. Au total 1314 poissons seront utilisés. Les analyses d'expression de gènes/ d'activité enzymatiques (évaluation des synthèses chimiques et de réactions aboutissant à la production d'une protéine et à son activité) / de mécanismes relatifs au métabolisme glucidique seront faites sur des truites d'élevage (12 alevins par condition ou 9 juvéniles de 70g par condition) sous deux conditions d'hypoxie (et un témoin en normoxie, niveau d'oxygène normal) et un régime riche en glucides digestibles (témoin avec un régime sans glucide). Remplacement : les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme glucidique et meilleure utilisation des glucides alimentaires) ne peuvent être observés qu'*in situ*. Raffinement : aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants Réduction : le nombre de poissons prélevés est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures.

6939. L'hypertension artérielle est une cause majeure de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. C'est un important facteur de risque cardiovasculaire, neurologique et rénal. Le rein adapte quotidiennement l'excrétion urinaire de chlorure de sodium aux apports alimentaires de manière à maintenir une homéostasie parfaite du chlorure de sodium dans l'organisme. L'incapacité du rein à réguler correctement la balance sodée entraînant une rétention sodée, est à l'origine d'une augmentation de la pression artérielle. Dans la partie terminale du néphron (tubule contourné distal, tubule connecteur et canal collecteur), la régulation de la réabsorption de sodium permet de modifier l'excrétion urinaire de sodium. Les protéines membranaires (canaux, pompes, cotransporteurs) transportant le chlore et le sodium commencent à être bien connues. Par contre, les mécanismes intracellulaires de régulation de ces protéines sont beaucoup moins étudiés ainsi que les systèmes hormonaux qui les régulent. C'est ce que nous proposons d'étudier dans ce protocole.

L'étude du transcriptome des cellules de la partie terminale du néphron (en cours de publication) nous a permis de mettre en évidence plusieurs systèmes qui pourraient influencer sur le transport de sodium dans ces segments. Pour étudier un de ces systèmes sur la fonction du rein et leurs rôles dans la régulation de la réabsorption de sodium et la régulation de la pression artérielle, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal inactivé pour un de ces systèmes dans le rein.

Différentes procédures expérimentales permettront de déterminer si ce système est impliqué dans la régulation de la pression artérielle et de l'état acidobasique. Nous estimons que 490 souris seront nécessaires afin de faire une étude cinétique et statistique pour un programme de recherche de 5ans. Une cinquantaine de souris servent à maintenir l'élevage. Nous adapterons le nombre d'animaux à la baisse dans le respect de la règle des 3R si les protocoles ou les résultats de nos expériences le permettent. Un enrichissement de l'environnement des animaux sera également entrepris : pipette de l'abreuvement automatique, nids végétaux, tunnels en carton ou maison/igloo en plastique, litière en copeaux, pas d'animaux isolés lors de l'élevage. Lors des expériences, des points limites ont été définis permettant d'exclure les animaux en souffrance et des périodes d'acclimatation ont été établies pour les cages à métabolisme.

Les animaux sont hébergés dans des conditions d'hygrométrie et de température adaptées à l'espèce. Une alternance jour/nuit est en place dans les zones d'élevage et d'expérimentation pour respecter le rythme chronobiologique des animaux. Ces conditions sont surveillées en permanence par logiciel via des capteurs de mesure.

Un modèle animal pour l'étude d'un système intégré comme le fonctionnement du rein est nécessaire pour tester nos hypothèses, un bon modèle cellulaire n'est pas disponible pour les cellules rénales.

6940. La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) est une maladie génétique causée par une expansion de triplet CTGn>50 dans la région 3' non codante du gène DMPK, et caractérisée par une myotonie, une faiblesse musculaire progressive, des troubles cardiaques ainsi que cognitifs. Les ARN mutés contenant des répétitions CUG (d'ARN-CUGexp) forment des agrégats nucléaires qui séquestrent les facteurs MBNL, régulateurs de l'épissage alternatif conduisant à des anomalies de maturation des ARNs hétérologues et ultimement, à des symptômes cliniques comme la myotonie et la faiblesse musculaire. Actuellement il n'existe pas de traitement pour cette maladie cependant des approches thérapeutiques basées sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO) ciblant les ARN-CUGexp afin d'inhiber leur toxicité ont montré des résultats prometteurs.

L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* l'efficacité d'ASO chimérique de type morpholino (PMO) couplés au peptide de pénétration cellulaire Pip6a (P-PMO), à l'aide de modèles murin de la DM1. Tout d'abord, des injections intramusculaires de P-PMO-CAG seront réalisées dans des souris HSA-LR exprimant 220 répétitions CTG dans le muscle squelettique afin de vérifier la correction d'anomalies moléculaires associées à la mutation DM1. Si une correction est observée, une administration de cet ASO par voie systémique sera réalisée dans ces animaux afin d'évaluer son efficacité comme approche thérapeutique. Enfin si des améliorations phénotypiques sont confirmées les P-PMO-CAGs seront évalués dans un second modèle de souris DMSXL qui exprime le gène muté de la DMPK humain avec plus de 1000 répétitions CTG de manière ubiquitaire.

En conformité avec les exigences de remplacement et la règle des 3Rs, nous avons tout d'abord confirmé et validé *in vitro* l'efficacité des P-PMO-CAG à l'aide de modèles cellulaires. Cependant l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de P-PMO-CAG comme approche thérapeutique nécessite d'avoir recours à des modèles de souris transgéniques qui expriment la mutation DM1 et reproduisent la pathologie. Des conditions d'hébergement avec un maximum de 6 souris associé à un programme d'enrichissement du milieu et de soins appropriés seront mises en place et une attention particulière sera portée pour réduire d'éventuelle douleur, angoisse ou souffrance. Des modifications importantes de comportement laissant supposer une douleur ainsi qu'une perte de poids de 20% seront considérés comme critères d'arrêt en cours d'expérimentation et conduiront à l'euthanasie des animaux concernés. Afin de réduire et d'optimiser le nombre d'animaux, ce projet se déroulera en plusieurs étapes. Ainsi la réussite de la première étape détermine la poursuite, la mise en place et l'utilisation d'animaux supplémentaire prévue dans la seconde étape, et ainsi de suite. Si les résultats sont positifs, un maximum de trois cent soixante-deux souris sera inclus dans le projet.

6941. Depuis le 1er janvier 2013, les autorités françaises ne délivrent plus d'autorisation nominative d'expérimenter, cependant tous les personnels doivent posséder une qualification appropriée à leur fonction : conception de projets, application de procédures expérimentales aux animaux, soins aux animaux, mise à mort des animaux. Ce point a d'ailleurs été renforcé par la directive 2010/63/UE et le décret 2013-118 qui imposent, en plus d'une formation spécifique, le maintien des compétences par une formation continue tout au long de la carrière des personnels.

Ce programme de formation continue, dans les domaines liés à la pratique professionnelle des personnels, représente l'équivalent de trois jours sur une période de six ans, pour assurer le maintien des compétences.

L'objectif de cette demande concerne l'utilisation d'animaux dans le cadre d'un programme de formation aux gestes techniques de l'expérimentation animale pour le maintien des compétences. Deux espèces de rongeurs seront utilisées, le rat Wistar et la souris Swiss. Pour les rats, nous utiliserons 3 séries de 6 rats pour la formation aux identifications (tatouage et bagues), aux injections (sous-cutanée, intraveineuse, intrapéritonéale et administration orale) et aux prélèvements. Pour les souris, nous utiliserons 3 séries de 18 souris pour la formation aux injections (sous-cutanée, intraveineuse, intrapéritonéale et administration orale), aux identifications (tatouage et bagues) et aux prélèvements.

Pour toutes ces procédures, la règle est 3R est respectée, les animaux recevront des injections de NaCl à 0.9% et un nombre minimum d'animaux a été choisi, 1 rat et 3 souris par personnel (principe de réduction). Le maintien des compétences techniques ne peut se faire que par la pratique et donc il n'est pas possible de remplacer l'animal. L'ensemble des procédures est encadré par des tuteurs compétents sur les gestes techniques afin de garantir la bonne réalisation des gestes et le bien-être animal (principe de raffinement). Le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 270 souris et 90 rats maximum pour 5 ans.

6942. Les coccidioses aviaires sont des maladies dues à l'infection par des protozoaires parasites, les coccidies du genre *Eimeria*, qui sont très fréquentes et d'un intérêt sanitaire et économique majeur. Les parasites se développent dans l'intestin grêle et les *caeca* des oiseaux et entraînent malabsorption et lésions plus ou moins profondes de l'épithélium intestinal. Les coccidioses sont caractérisées par des retards de croissance, de la diarrhée et de la prostration. Elles favorisent l'émergence d'autres troubles liés à des agents pathogènes opportunistes. Les moyens de lutte doivent être mis en place en connaissance de cause. Notamment, les traitements curatifs ne devraient être mis en œuvre qu'après un diagnostic de certitude de la maladie.

Afin d'aider au diagnostic pertinent de coccidiose, il est envisagé d'organiser des formations avec une partie théorique sur la biologie des parasites et les éléments de diagnostic pertinent illustrés par des photos afin de réduire le nombre de poulets et de dindons pour la partie pratique, et une partie pratique avec des poulets et des dindons préalablement infectés pour montrer les altérations comportementales, la dégradation des matières fécales et les lésions du tube digestif qui sont le critère de diagnostic le plus important. Il est prévu d'effectuer cinq formations sur poulets et une formation sur poulets et dindons chaque année, pendant deux ans. Le nombre total de sujets pour ces formations est de 582 poulets et 30 dindes.

Ces formations sont destinées aux personnes réalisant du diagnostic sur le poulet et la dinde. Le niveau des participants va du technicien avicole au vétérinaire, en passant par le laborantin qui pratique des autopsies. Le nombre de participants est limité à dix.

Les formations portent sur le poulet seul ou le poulet et la dinde. Les oiseaux sont hébergés dans des animaleries exemptes de coccidies jusqu'au transfert dans l'animalerie servant à la formation. L'âge à la mise en place est de 20 jours. La séance de formation se passe avec des oiseaux âgés de 28 jours. Cet âge correspond à l'âge auquel les problèmes de coccidiose sont le plus fréquemment rencontrés sur le terrain.

Les infections parasitaires se font entre 4 et 7 jours avant la date de la séance, en fonction des espèces de coccidies (cycle de développement spécifique à chaque espèce de coccidie). Le but est de permettre un développement suffisant des parasites pour pouvoir observer les manifestations cliniques et les lésions du tube digestif lors de la séance.

3R : l'objectif étant une formation pratique, l'utilisation de poulets et de dindes vivants est impérative. Cependant, le nombre d'animaux est réduit au minimum et des photos et vidéos seront utilisées pour compléter la formation. Les volailles seront hébergées à plusieurs dans des cages enrichies. Si un animal atteint un niveau de détresse défini par le point limite (prostration intense et station debout impossible), il sera euthanasié.

6943. L'objectif de ces expériences est de comprendre comment le cerveau forme une représentation du temps. Afin d'atteindre cet objectif, l'activité électrique de neurones dans le cerveau de singes macaques entraînés sera enregistrée et perturbée par injections pharmacologiques et/ou micro-stimulation électrique. Comprendre comment le cerveau forme une représentation du temps chez le primate non-humain doit permettre d'offrir une meilleure compréhension du fonctionnement du cerveau chez l'homme. Plus précisément, le but du présent projet est de tester l'hypothèse que l'expectation temporelle repose sur le fonctionnement normal d'un type de récepteur particulier (les récepteurs NMDA) et du cortex frontal dorsomédian. En cas de fonctionnement anormal de ces récepteurs, l'organisation temporelle des mouvements et de la cognition seraient fortement perturbés.

Au total 6 animaux seront nécessaires pour mener à bien ces études (6 animaux pour les 3 protocoles). Protocole 1) enregistrements électrophysiologiques, 2) microstimulation, 3) modulations pharmacologiques.

Réduction :

Afin de réduire à 6 le nombre d'animaux, ceux-ci participeront à tous les protocoles. En effet, ces protocoles ne provoquent pas de lésions irréversibles et rien ne s'oppose à ce que le même animal participe à plusieurs protocoles.

Raffinement :

Les critères d'interruptions des expériences seront les suivants : comportement anormal des animaux suggérant un inconfort majeur et/ou de la douleur pendant la réalisation des protocoles.

Remplacer :

L'utilisation de modèles mathématiques nous permettra également de tester de nouvelles hypothèses avant d'avoir recours à la validation expérimentale et/ou à perfectionner ces modèles prédictifs. A long terme, ceci réduira l'utilisation d'animaux.

Les retombées de ce projet sont doubles. 1. Au niveau physiologique, cette étude devrait révéler les mécanismes intimes impliqués dans la cognition temporelle. 2. Au niveau clinique, nos investigations pharmacologiques devraient améliorer notre compréhension des troubles résultant de perturbations de la cognition temporelle et suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des patients chez lesquels la désorganisation de la cognition temporelle est responsable d'une part importante de la symptomatologie (e.g. schizophrénie, ADHD).

Le choix du singe Rhésus est justifié étant donné l'organisation générale de leur cerveau qui est similaire à celle de l'homme. Plus particulièrement, de nombreuses études ont suggéré que des fonctions cognitives supérieures comme la perception temporelle ne peuvent s'étudier que chez des animaux possédant un cortex frontal développé.

6944. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies neuromusculaires chez l'enfant. Elle est due à des mutations dans le gène de la dystrophine. Notre équipe a montré une restauration efficace de la synthèse de dystrophine par saut de l'exon muté chez le modèle murin et canin de la maladie par expression de séquences antisens de l'exon muté via un petit ARN nucléaire dérivé du snRNA-U7. Cet U7 est exprimé dans le muscle via des vecteurs viraux AAV (AAV-U7) qui sont des vecteurs de thérapie génique dérivés du virus adéno-associé à l'adénovirus. Malheureusement, le bénéfice thérapeutique est moindre dans la souris mdx, déficiente pour la dystrophine, par rapport à une souris contrôle. Le but de ce projet est d'évaluer l'efficacité de transduction des AAV dans un muscle dystrophique et en particulier d'évaluer l'impact de la centro-nucléation des myofibrilles et de la fibrose endomysiale, caractéristiques des muscles dystrophiques, sur cette efficacité.

Le nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet est de 192 souris dont 144 souris C57BL/6 et 48 mdx.

Les injections d'AAV effectuées n'engendrent pas de douleur. Les injections d'agents induisant la régénération musculaire seront suivies par une administration d'analgésiques. Les protocoles durent entre 1 et 6 mois suivant l'objectif final avant euthanasie.

Les conditions d'hébergement et l'enrichissement du milieu sont gérés par l'animalerie. Elles consistent en un contrôle quotidien des cages, un changement régulier, une gestion pour un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum). Le changement des cages se fait sous hotte aspirante et les cages possèdent des filtres. L'enrichissement du milieu consiste en l'ajout de laine de bois afin que les souris puissent faire un nid ainsi que de lanières de papier Kraft et des tunnels en carton.

Notre stratégie d'expérimentation afin de réduire au minimum le nombre d'animaux est basée sur notre expérience dans le domaine qui nous a montré que pour assurer la validité statistique des résultats, les expérimentations *in vivo* peuvent être effectuées sur seulement 6 animaux par lot expérimental et l'expérience répétée 2 fois. Cela permet une analyse statistique par test de Student des résultats obtenus et de mettre en œuvre la suite des expériences sur des bases solides.

6945. Les cellules microgliales sont les cellules sentinelles du cerveau. Elles maintiennent l'homéostasie cérébrale au travers d'une constante motilité de leurs processus et la capacité à phagocyter des débris cellulaires ou tout élément susceptible de perturber l'équilibre cérébral.

Afin de répondre efficacement à toute situation physiologique ou pathologique, la microglie exprime à sa surface une grande quantité de récepteurs lui permettant de discriminer ses cibles (encore appelées signaux "eat-me" ou « mangez-moi ») et de les discriminer du reste du parenchyme, notamment les cellules vivantes (qui expriment des signaux "don't eat-me" ou « ne me mangez pas »).

Nos résultats antérieurs ont montré que la nutrition lipidique, et plus spécifiquement une carence nutritionnelle en omega-3, modulait l'activité phagocytaire de la microglie. Les effets des omega-3 sur la microglie passeraient notamment par une surexpression de deux types de récepteurs aux lipides : CD36 (récepteur impliqué dans la reconnaissance et l'internalisation de certains lipides) et CB1 (récepteur aux endocannabinoïdes). Des données de la littérature suggèrent que ces récepteurs auraient la capacité de moduler l'activité phagocytaire de la microglie mais les mécanismes et les conditions physio-pathologiques dans lesquels ces récepteurs sont activés dans notre contexte nutritionnel restent largement méconnus.

L'objectif de notre projet est de mieux comprendre le rôle de CD36 et de CB1 dans la régulation de l'activité microgliale.

Nombre total d'animaux utilisés : 336.

Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par méthodes statistiques classiques. Nous ne pouvons remplacer les animaux par d'autres techniques telles que la culture cellulaire. En effet, les cellules microgliales, une fois mises en culture, changent de phénotype pour exprimer les gènes de macrophages et non plus les gènes spécifiques de la microglie. Nous prenons enfin en compte le bien-être des animaux via l'enrichissement des cages, la stabulation en cages collectives, la prise en charge de la douleur si nécessaire et l'euthanasie des animaux si les points limites sont dépassés.

6946. Le mouvement du noyau est requis lors de la migration cellulaire. Nous avons trouvé qu'une protéine de l'enveloppe nucléaire est impliquée dans le mouvement nucléaire et la migration cellulaire. De plus cette protéine est retrouvée mutée dans certains médulloblastomes, la forme la plus commune de tumeur cérébrale maligne et la majeure cause de létalité dans le cancer infantile. L'absence du gène codant pour cette protéine est létale pour la souris au stade embryonnaire. Le projet utilise des souris pour lesquelles ce gène peut être excisé grâce à des séquences Lox. Cette excision et donc la perte d'expression peut se faire préférentiellement, dans certains tissus ou à un certain moment du développement, par croisement avec des souris ayant une expression de la protéine d'excision Cre localisée dans ces tissus ou inductible. Le but est de retirer le gène seulement dans certains tissus ou à des stades spécifiques de développement afin d'étudier la fonction de ce gène dans des organes spécifiques comme le cerveau et le muscle. Une lignée possède notre gène d'intérêt entouré de séquences Lox, les 7 autres possèdent le gène Cre sous l'influence de promoteurs permettant une expression à des temps spécifiques lors du développement du cerveau ou des muscles squelettiques. Afin de limiter au maximum le recours à l'utilisation de souris pour l'obtention de réponses à nos questions, les expériences seront, dans la mesure du possible réalisées *in vitro* avec des lignées cellulaires. Ce n'est qu'en dernier recours que nous utiliserons le système murin. De même, les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. 8 lignées différentes seront utilisées dans cette étude, c'est pourquoi nous prévoyons qu'un maximum de 200 souris (adultes) pourra être utilisé. Dans les situations de reproduction ou de stress dû à l'expérimentation, la nourriture pourra être mise à disposition sur le plancher de la cage. De la laine de bois pourra être ajoutée afin de permettre la création d'un nid.

6947. Les troubles psychiatriques tels que la dépression, l'anxiété et la schizophrénie sont les principales causes d'incapacité dans le monde et ont un impact sociétal très important. Cependant, malgré des avancées majeures dans la compréhension de la base moléculaire de ces maladies au cours des dernières années, les efforts pour découvrir et développer de nouveaux médicaments pour les troubles neuropsychiatriques ont été relativement infructueux, conduisant à une sensibilisation accrue aux limites des approches traditionnelles actuelles. De toute évidence, des approches multidisciplinaires nouvelles sont nécessaires pour résoudre ce problème, en utilisant de nouveaux modèles transposables de la recherche préclinique au patient. Ce projet de recherche vise à développer et valider de nouvelles approches multidisciplinaires d'étude/ d'observation de la structure du cerveau afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ces troubles psychiatriques/neurologiques et enfin de mieux les traiter.

Ce travail pour but ultime de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de bloquer le développement des troubles psychiatriques de type schizophrénie, induits par le cannabis chez le rongeur (études précliniques) et enfin chez l'homme (études cliniques). Le recours à l'utilisation d'animaux de laboratoire est nécessaire sur certaines parties de notre projet, ou les approches *in vitro* ne sont parfois pas possibles. Le nombre d'animaux sera le plus petit possible, mais permettant de réaliser tout de même une analyse statistique de ces résultats. Ces travaux nécessiteront au maximum 276 rats et 30 souris, pour une durée de 5 ans. Un grand soin sera porté afin d'empêcher tout stress ou souffrance aux animaux, comme un suivi clinique journalier utilisant l'échelle validée par le comité d'éthique, les conditions d'élevage et enfin le modèle animal qui a été réfléchi afin de garantir le bien-être animal.

6948. L'objectif de notre projet est d'identifier les mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 ont un rôle protecteur dans le développement de la dépression.

La dépression touche 100 millions de personnes en Europe chaque année, cependant il n'existe pas aujourd'hui de traitement réellement efficace. C'est pourquoi il est urgent de mieux comprendre les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent le développement de la dépression chez certains individus et au contraire, la résilience chez d'autres. Dans ce contexte, notre laboratoire

a récemment démontré que chez la souris, une supplémentation en oméga-3 permettait d'augmenter la résistance des animaux face au développement de comportements de type anxieux et dépressifs qui sont induits par un protocole de stress chronique de défaite sociale. L'objectif de notre projet est désormais d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes neurobiologiques par lesquels les oméga-3 contenus dans l'alimentation permettent de protéger les animaux. L'objectif à long terme de ce projet est de transférer les connaissances acquises chez le rongeur à l'homme pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et nutritionnelles en particulier pour endiguer les troubles dépressifs et anxieux.

Notre projet implique la mise en œuvre du protocole de stress chronique de défaite sociale chez des souris mâles adultes C57/B16J par des souris CD1 mâles (anciens reproducteurs). Ce protocole est reconnu pour induire des comportements de type anxieux et dépressif chez le rongeur et il bénéficie d'une bonne validité éthologique. De plus, ce protocole permet de différencier les animaux en deux sous-populations car 30 à 50 % d'entre eux sont résilients et ne développent pas de troubles du comportement. Le protocole de stress chronique de défaite sociale permet donc d'étudier dans de bonnes conditions les mécanismes neurobiologiques de la résilience et de la susceptibilité aux troubles anxieux et dépressifs. Une attention particulière sera portée aux animaux subissant la défaite sociale pour que leurs conditions de vie soient les meilleurs possibles en dehors du développement de troubles anxieux et dépressifs.

En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et atteindre une signification statistique, nous estimons que 12 animaux par groupe expérimental seront nécessaires pour mener à bien notre projet. Ceci représente un total de 576 souris sur 3 ans (288 C57/B16J et 288 CD1).

6949. Les syndromes épileptiques du lobe temporal (TLE) représentent la forme la plus commune d'épilepsie partielle chez l'adulte (30-40% de toutes les formes d'épilepsie). Cette forme d'épilepsie est le plus souvent résistante aux traitements pharmacologiques. Il est donc crucial de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette pathologie afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans cette forme d'épilepsie, les neurones atteints se trouvent dans le lobe temporal du cerveau, en particulier dans une région qui joue un rôle clé dans la mémoire : l'hippocampe. De plus, la TLE est souvent associée à des déficits cognitifs, mettant en évidence une implication du lobe frontal, et en particulier du cortex préfrontal.

La TLE peut être mimée chez le rongeur par une injection intrapéritonéale d'acide kaïnique, toxine provoquant des crises. Le modèle kaïnate représente donc un bon modèle d'étude de la TLE. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre les circuits et mécanismes qui sous-tendent la TLE. Pour cela, nous allons utiliser les enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez un modèle murin de TLE (le modèle kaïnate) qui nous permettront d'étudier les modifications d'activité neuronale dans l'hippocampe et le cortex préfrontal au cours des crises épileptiques et de tester l'effet de différentes concentrations d'une molécule candidate qui pourraient améliorer les crises. En effet, cette molécule a déjà été testée comportementalement sur des souris et les résultats montrent une diminution du nombre et de la durée des crises épileptiques et une baisse du taux de mortalité. L'électrophysiologie *in vivo* nous permettra donc de mieux comprendre les mécanismes physiologiques qui sous-tendent cette amélioration.

Pour ce projet, et dans le respect éthique de la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement), 4 groupes de 15 souris mâles au stade adulte seront utilisées, soit 60 souris : un groupe servira de contrôle afin de mettre en évidence les modifications d'activité neuronale au cours des crises épileptiques et les 3 autres groupes seront testés avec différentes concentrations d'une molécule candidate. Le système d'enregistrement électrophysiologique sera implanté sous anesthésie générale avec une analgésie pré et post opératoire. Après implantation, un suivi quotidien des animaux sera réalisé et une grille de score permettra d'évaluer l'état de santé de l'animal. Au-delà d'un certain score, mettant en évidence une souffrance, l'animal sera euthanasié.

6950. En élevage, les volailles peuvent souffrir de nombreuses maladies, souvent multifactorielles, et qui affectent à la fois la productivité (mortalité, retard de croissance, déclassement des carcasses, chute de ponte) et le bien-être des animaux. Plusieurs de ces maladies sont respiratoires ou à point d'entrée respiratoire car l'organisation et le fonctionnement particuliers de l'appareil respiratoire des oiseaux le rend particulièrement vulnérable aux pathogènes.

Ainsi, les souches bactériennes d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) peuvent engendrer diverses pathologies, toutes extra-intestinales, et notamment une infection systémique à point de départ respiratoire qui est caractérisée par des lésions fibrineuses des séreuses associées à une septicémie et qui peut aboutir à la mort de l'animal.

Cependant, et bien que la colibacillose aviaire soit la première cause de pertes économiques d'origine bactérienne dans les élevages, les réponses immunitaires de l'hôte face à cette infection, notamment au niveau respiratoire, restent mal connues et peu étudiées alors que leur connaissance permettrait de mieux contrôler la pathologie.

Le présent projet a pour objectif d'identifier les différents acteurs du système immunitaire inné qui interviennent lors d'une infection respiratoire aviaire par *E. coli*, et qui pourraient éventuellement être liés à une plus forte sensibilité ou résistance des animaux à la colibacillose. Il s'inscrit dans un projet plus vaste qui vise notamment à décrypter les réponses immunitaires mises en jeu lors de co-infections respiratoires virale et bactérienne, ce qui est majoritairement le cas sur le terrain. Un prérequis à l'étude de cette co-infection est de connaître la réponse immunitaire vis-à-vis de chacun des agents causaux, ici, *E. coli*.

Nous allons donc infecter des animaux avec *E. coli*, déterminer la charge bactérienne dans les organes et analyser les paramètres immunologiques. Ce projet utilisera 249 animaux.

L'ensemble de ce projet utilisera 249 animaux (24 pour l'expérimentation préliminaire et 225 pour l'expérimentation elle-même).

Ces expérimentations répondent aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : La réponse immunitaire mise en jeu lors d'une infection du poulet par *E. coli* résulte d'un ensemble complexe de paramètres qu'il est impossible de remplacer par des approches *in vitro*.



Réduction : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de l'expérimentation et permet d'identifier les paramètres immunitaires mis en jeu lors d'une infection colibacillaire.

Raffinement : Les animaux sont maintenus dans des cages ou des isolateurs adaptés en nombre et en taille, dans des conditions environnementales contrôlées, avec nourriture et boisson à volonté. Ils bénéficient d'un enrichissement comportemental.

6951. Les infections par le protozoaire *Cryptosporidium parvum* sont très fréquentes à travers le monde et conduisent à des pertes économiques importantes chez les ruminants et affectent aussi la santé humaine. Ce parasite se développe dans les cellules intestinales des animaux et provoque des diarrhées pouvant conduire dans certains cas à la mort. Devant l'absence de vaccin (en santé humaine ou vétérinaire) et de traitement efficace, il est nécessaire de rechercher de nouveaux moyens de contrôles visant à renforcer les défenses naturelles des jeunes animaux pour un meilleur contrôle de la cryptosporidiose.

L'objectif de ce projet est de tester l'effet protecteur de différents immunostimulants dans le modèle de souriceau nouveau-né et de décortiquer les mécanismes immunologiques mis en jeu lors de ces traitements. Le modèle souris est très utilisé pour les études fondamentales en immunologie mais également pour les essais de traitement. Les souris développent l'infection et éliminent naturellement le parasite en 3 semaines comme le font les jeunes ruminants. La souris adulte est relativement résistante à l'infection sauf si elle est déficiente pour des composants de la réponse immunitaire. Pour cela, des souris C57BL/6J âgées de 3 à 7 jours sont infectés par voie orale avec le parasite et reçoivent ou non un immunostimulant (par voie orale ou intra-péritonéale) afin d'évaluer sa capacité à réduire l'infection par mesure du nombre de parasite dans l'intestin. Le mécanisme immunitaire mis en jeu dans cette protection sera analysé en réalisant des prélèvements de tissus à la fin de l'expérimentation.

Ce projet sur 5 ans évaluera de nombreux immunostimulants et les mécanismes immunologiques mis en jeu suite à leur administration pour favoriser le contrôle des infections par *C. parvum*. Le nombre d'animaux est estimé pour les 5 ans entre 2160 à 2880 souriceaux et 360 à 480 mères souris adultes (femelles allaitantes) soit 3360 animaux maximum.

Les expérimentations seront menées à bien selon le principe des 3R.

Raffiner : Pour que les mères souris s'occupent bien de leurs petits, du coton et une boîte à œuf sont introduits dans chaque cage, ainsi la mère fabrique un nid pour sa progéniture.

Réduire : Pour pallier la perte éventuelle de souriceaux due à l'état de stress qui caractérise les souris C57BL/6, plus d'animaux seront mis en reproduction. Les animaux surnuméraires sont toujours utilisés et peuvent être introduits dans un autre protocole. Enfin, les immunostimulants non commerciaux seront tous préalablement validés *in vitro* pour leur capacité à stimuler fortement les cellules immunitaires permettant de réduire ensuite le nombre d'animaux utilisés.

Remplacer : l'étude de l'immunologie de la muqueuse intestinale dans un contexte infectieux ne peut être réalisée sans expérimentation animale. En effet, les études *in vitro* ne tiennent pas compte de la complexité des coopérations cellulaires et de l'environnement intestinal (flore bactérienne et antigènes alimentaires).

Du point de vue statistique, nous utiliserons des modèles statistiques mixtes qui tiennent compte à la fois des facteurs à effet fixe (exemple Infection ou déficience génétique de l'animal ou traitement immunostimulant) et des facteurs à effet aléatoire (répétition des expériences).

6952. Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes qui sont responsables de la synthèse des mélanines, pigments photo-protecteurs contre les rayons UV du soleil. Le mélanome est une tumeur extrêmement agressive possédant un fort potentiel métastatique. S'il est diagnostiqué assez précocement, une chirurgie peut suffire à le traiter. Cependant, dès lors qu'il y a apparition de métastases, le pronostic vital devient très négatif en raison de l'inefficacité de tous les traitements actuels. Au stade métastatique ganglionnaire, le taux de survie à 5 ans est inférieur à 50% et au stade de métastases viscérales, la médiane de survie est inférieure à 6 mois. Le mélanome, qui ne représente que 5% des cancers cutanés, entraîne alors 80% des décès associés à ce type de cancer. Actuellement, son incidence double tous les 10 ans (10 000 nouveaux cas en 2007), ce qui en fait un réel problème de santé publique.

Récemment des thérapies ciblées ont été développées mais les réponses restent transitoires car elles ne ciblent pas tous les mélanomes. De plus, après une courte période de rémission, le mélanome acquiert une résistance, augmentant d'environ 2 mois l'espérance de vie du patient. D'autres thérapies ont été mises en place telles que l'immunothérapie qui va réactiver la réponse immunitaire du patient mais ces thérapies ne donnent une réponse positive que dans 10 à 30% des patients. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux traitements.

Nous nous sommes intéressés aux effets des antidiabétiques. Plusieurs expérimentations ont montré que ces composés étaient capables d'induire la mort des cellules de mélanomes. Nous avons synthétisé plusieurs dérivés de ces antidiabétiques qui induisent également la mort des cellules de mélanome sans affecter la viabilité de cellules normales. Afin d'avoir une approche plus physiologiques, nous aimerions tester ces différentes molécules sur des modèles de rongeurs. Nous réaliserons des expériences de xéno greffes ainsi que de développement de métastases chez la souris nude, à partir de cellules de mélanomes humains possédant différents statuts mutationnels ou bien à partir de cellules de mélanome humain possédant une extinction d'un gène cible spécifique. Ces animaux ont un système immunitaire affaibli leur permettant de recevoir des cellules humaines sans risque de rejet. Nous effectuerons ensuite, des expériences d'allogreffes chez des souris C57Bl/6j à partir de cellules de mélanome murin afin d'observer les effets de nos composés dans des souris possédant un système immunitaire complet. Enfin nous étudierons l'effet de nos composés dans des souris modifiées génétiquement qui développent, sous induction, des mélanomes possédant des caractéristiques analogues aux mélanomes humains.

En termes de remplacement, des études *in vitro* sont réalisées pour définir les concentrations optimales d'utilisation des différents composés. Nous utiliserons le nombre d'animaux le plus restreint permettant l'analyse statistiques des résultats. D'autre part, tous

les demandeurs sont titulaires d'une formation B, et les animaux seront observés quotidiennement afin de prendre en charge, précocement, tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort.

Nous utiliserons un total 2120 souris dans ce projet.

6953. Des études ont montré que le système nerveux périphérique pouvait réguler le système immunitaire (SI). De quelle façon ? La libération des neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine, l'adrénaline ou la noradrénaline) lors de la stimulation de nerfs périphériques peut agir directement sur les cellules du système immunitaire. Il a ainsi été montré que les organes lymphoïdes secondaires reçoivent une innervation importante de nerfs périphériques. Par ailleurs, on peut détecter l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du système immunitaire. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques dans le but de modifier l'activité du système immunitaire est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est déjà utilisée pour le traitement de maladies comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50000 patients dans le monde sont implantés avec des micro-stimulateurs. Les effets de ces électrostimulations du nerf vague sont actuellement recherchés dans des maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde. En effet, il a été montré que, dans des modèles d'inflammation chez la souris, l'électrostimulation du nerf vague induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats suggèrent donc que la stimulation du système nerveux sympathique pourrait prévenir le choc septique chez l'animal.

Le but de notre projet est d'évaluer la possibilité de prévenir le choc septique par stimulation des nerfs périphériques (nerf splénique ou nerfs sinuso-carotidien). Le choix de ces nerfs tient au fait que leurs sections entraînent une augmentation de l'inflammation consécutive à l'injection d'une endotoxine bactérienne, le LPS, (dérivé de la paroi bactérienne) par comparaison avec les animaux témoins.

Les différentes étapes du projet consisteront à implanter une électrode de stimulation au niveau de ces nerfs et à réaliser une électrostimulation pour évaluer :

- 1- Détermination des conditions de stimulation électrique des nerfs splénique et sinuso-carotidien nécessaires à l'inhibition de l'inflammation induite par l'injection d'endotoxine bactérienne (LPS) à court terme (procédure n°1)
- 2- la nature des neurotransmetteurs mis en jeu lors de l'inhibition de la sécrétion des cytokines inflammatoires induite par l'électrostimulation des nerfs splénique et sinuso-carotidien (procédure n°2)
- 3- Détermination des schémas thérapeutiques (durée de stimulation, nombre de stimulations) d'électro-stimulation des nerfs splénique et sinuso-carotidiens permettant de diminuer les marqueurs de l'inflammation à long terme (procédure n°3)
- 4- effet de l'électro-stimulation des nerfs splénique et sinuso-carotidiens sur la survenue du choc septique (procédure n°4)

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 900. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés. Enfin, l'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire.

6954. Les dispositifs orthodontiques déploient des forces plus ou moins lourdes sur les dents de nos patients. L'apparition de nouveaux matériaux réduisent considérablement les effets néfastes que peut provoquer l'orthodontie (résorption, ankylose, fenestration osseuse...). Bien que moins fréquents, ces événements indésirables peuvent encore survenir lors des traitements orthodontiques.

De plus certains points restent à discuter :

- Comment prévenir l'apparition de ces effets secondaires en orthodontie ?
- Peut-on repérer les patients à risque ? (Par la radiologie? Des marqueurs biologiques ? Ou autre ?)
- De la même façon est-il possible d'évaluer la force idéale de déplacement pour optimiser, voire accélérer, les traitements ?

L'objectif de notre étude est de quantifier les mouvements dentaires réalisés en fonction de la force appliquée sur une dent chez un rat. Nous avons choisi de travailler avec des rats vu que ce sujet est le modèle décrit pour ce genre d'expérimentation. C'est le modèle le plus largement utilisé dans la littérature nationale et internationale. Nous réaliserons grâce à ces données une modélisation mathématique du mouvement de la dent en fonction de la force appliquée, ce qui nous permettra de passer après plusieurs tests à des essais cliniques sur l'homme. L'objectif final est de créer un logiciel, applicable sur l'homme à terme, afin de guider l'orthodontiste sur la force optimale que l'on peut appliquer sur une dent sans créer d'effets néfastes. La partie orthodontique repose sur la réalisation de mouvement dans le plan antéo-postérieur, à l'aide de ressorts délivrant différentes forces (25, 50 et 100g) entre l'incisive et la molaire du rat au maxillaire, après 1, 3, 7 ou 14 jours d'action des dispositifs. Le déplacement des dents sera évalué par la superposition d'empreinte dentaire numérisée de chaque animal avant et après l'application du dispositif. (Porte empreinte spécialisée). Nous travaillerons sur 58 sujets. Après sa validation, ce modèle numérique de simulation permettrait de réduire de façon significative le recours à l'expérimentation animale dans ce type de test. Ce dispositif est non invasif pour l'animal. De plus la pose et l'action durant les 15 jours du dispositif sont peu ou non douloureuses pour le rat.

Nous avons cherché à respecter la règle des 3R :

- Réduire : nous avons pris le minimum de sujet possible pour la validation de nos résultats.
- Remplacer : Nous avons choisi le rat, sujet plus petit et accessible que des animaux plus grands et controversés (chien).
- Raffiner : Ce dispositif est non invasif pour l'animal. De plus la pose et l'action durant les 15 jours du dispositif peu douloureuse pour le rat, tout comme ce genre que dispositif chez l'homme.

6955. Les chèvres laitières à haut niveau de production doivent recevoir une ration alimentaire adaptée à leurs besoins, donc de valeur nutritive précisément connue. Différentes équations de prédiction ont été proposées pour l'estimer à partir de leur composition chimique. Cependant, les productions de lait observées avec des animaux recevant certaines rations sont nettement plus faibles que celles attendues, avec des écarts variables suivant les animaux.

L'objectif de notre projet est de proposer des réponses à la filière caprine concernant l'utilisation d'aliments peu ou mal connus ou dont la valeur nutritionnelle est surestimée par les méthodes de mesure actuellement disponibles. Il s'agit de mieux cerner les différents aspects pouvant expliquer les variabilités inter-animaux en intégrant les facteurs de variation connus (niveau et vitesse d'ingestion, niveau de production et race) et en étudiant les animaux à différents niveaux de manière simultanée : animal entier, rumen, métabolisme, analyse et composition du lait, afin de limiter le nombre d'essais et de prélèvements.

Au cours des 5 années d'étude, la dizaine de rations testées contiendra des foin ventilés avec différents niveaux d'apport de concentré, ou des ingrédients dont on ne connaît pas la valeur nutritionnelle. L'expérimentation se fera, sur des chèvres laitières en début de lactation. Il est en effet important d'optimiser la valorisation de la ration alimentaire à cette période au cours de laquelle les animaux sont à leur maximum de production. Le projet comportera deux phases successives : une première phase (quatre semaines) avec trois groupes de 15 animaux menés en lots (soit 225 animaux, 5 répétitions en 5 ans). Un groupe recevra le régime habituel de la chèvrerie (groupe témoin). Les 2 autres groupes recevront les régimes à tester. Dans la seconde phase (quatre semaines), douze animaux (six par race) seront choisis dans chacun des deux groupes expérimentaux afin d'être le plus différents possibles en termes de production laitière, ce qui pourrait expliquer les variations inter-individus. Ils seront placés dans des cases individuelles pour mesurer leur cinétique d'ingestion (deux semaines), puis dans des cases à digestibilité (deux semaines).

La durée totale de l'expérience sera au maximum de 10 semaines, car du fait des contraintes liées au nombre de cases de digestibilité disponibles, une 1ère vague de 12 animaux enchainera directement les phases 1 (4 semaines) et 2 (4 semaines), tandis que la 2nde vague restera en lots pendant deux semaines supplémentaires ce qui portera à 6 semaines la durée de la phase 1, puis ce lot d'animaux enchainera la phase 2 de durée inchangée (4 semaines).

Les animaux seront pendant la moitié de l'expérience en lots, dans les conditions habituelles d'élevage. Comme les cases individuelles sont mitoyennes, les congénères voisines peuvent avoir un contact tactile. Leur comportement à la traite et leur niveau d'ingestion seront observés quotidiennement pour déceler toute anomalie très rapidement. Cette étude ne peut se faire qu'avec des animaux, puisque les résultats obtenus avec les méthodes classiques d'estimation sont en désaccord avec les observations sur le terrain. Nos travaux visent à répondre aux demandes de la filière caprine tout en approfondissant la connaissance de certains mécanismes physiologiques du ruminant.

6956. Ce projet s'inscrit dans un contexte de recherche préclinique sur les mécanismes physiopathologiques des douleurs neuropathiques. Les douleurs neuropathiques sont définies comme consécutives à une lésion ou une maladie affectant le système somatosensoriel. Il est observé en pratique clinique que certaines douleurs neuropathiques qui se sont estompées dans le temps réapparaissent à l'occasion d'un stimulus douloureux, en particulier un stimulus d'origine viscérale. A l'heure actuelle, ces phénomènes observés en pratique de soins courants n'ont été étudiés ni en clinique ni en recherche fondamentale. Une étude épidémiologique évaluant la réapparition d'anciennes douleurs après chirurgie coelioscopique digestive et gynécologique est en cours.

Notre projet vise à caractériser une procédure permettant de rationaliser dans un modèle murin cette réactivation d'anciennes douleurs neuropathiques, par une douleur viscérale aiguë telle qu'une irritation péritonéale. Pour cela nous aurons recours à un modèle souris ayant des douleurs neuropathiques. Il s'obtient après lésion constrictive du nerf sciatique et a été caractérisé par notre équipe. Ce modèle induit chez la souris une allodynie neuropathique (réaction douloureuse à un stimulus non douloureux) au niveau de la patte opérée pendant 2 à 3 mois et présente une évolution spontanément favorable. Passé ce délai, les souris ne présentent plus de signes douloureux, ces signes s'évaluent par la mesure de seuils de sensibilité mécanique. Nous induirons alors une irritation péritonéale par injection intrapéritonéale d'acide acétique et continuerons d'évaluer ces seuils. Notre hypothèse de travail est que cette stimulation viscérale aiguë par irritation péritonéale est susceptible de réactiver une allodynie qui avait disparu. A noter que l'irritation péritonéale induit une douleur aiguë qui s'estompe en 1 heure en moyenne chez la souris. Ce travail, qui s'inscrit comme une étude pilote dans un cadre de recherche translationnelle, pourra être ensuite poursuivi par des études aux niveaux cellulaires et moléculaires. Ce travail sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. D'une durée de 2 ans, il nécessite un effectif de 90 souris, calculé de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux requis pour l'étude, tout en gardant des résultats statistiquement fiables. Le raffinement est réalisé par un enrichissement de l'hébergement des souris (dispositif de nidation et frisure) et par une anesthésie générale des animaux lors des procédures invasives (chirurgie nécessaire à l'obtention du modèle). Le remplacement de ce modèle est impossible car l'objet de ce projet est d'étudier la mémoire douloureuse, ce qui nécessite un modèle intégré disposant de tous les circuits du système nerveux.

6957. Les modèles de xénogreffes dérivées de tumeurs de patient (PDX) représentent des modèles précliniques relativement pertinents de la pathologie humaine permettant l'exploration de nouveaux médicaments contre le cancer. Ces modèles sont basés sur le recueil de fragments de tumeurs provenant directement de patient (biopsie ou exérèse chirurgicale) implantés chez la souris immunodéprimées.

Récemment, il a été montré que ces modèles reflétaient parfaitement l'hétérogénéité tumorale contrairement aux lignées cellulaires clonales habituellement utilisées en laboratoire et conservaient également les caractéristiques histologiques et moléculaires de la tumeur d'origine. Actuellement, les modèles PDX provenant de tumeurs pédiatriques sont encore trop peu disponibles et sont limités

à des modèles provenant de tumeurs au moment du diagnostic. Malheureusement, un certain nombre de jeunes patients sont résistants aux traitements actuels ou sont en rechute avec un phénotype tumoral différent de celui fait au moment du diagnostic. Il est par conséquent indispensable pour les chercheurs en cancérologie pédiatrique de disposer de modèles précliniques représentatifs de ces tumeurs évoluant vers un pronostic péjoratif afin de mieux comprendre leur comportement en particulier lors de l'évaluation de nouveaux traitements.

Ce travail d'obtention de modèles pédiatriques précliniques en oncologie sera conduit en parallèle à un essai clinique multicentrique qui a pour objectif de définir individuellement les anomalies moléculaires pour chaque enfant à la rechute ou en situation d'échec thérapeutique. Il permettra donc d'obtenir une collection de tumeurs pédiatriques au niveau national qui sera mise à la disposition des chercheurs du consortium. A l'heure actuelle, ces modèles ne peuvent pas être remplacés par des approches alternatives *in vitro* notamment dû dans ces approches à l'absence d'une hétérogénéité tumorale et à l'absence du microenvironnement tumoral (remplacement).

Pour ce projet, nous aurons la possibilité de recueillir une vingtaine de biopsies tumorales par an qui seront implantées au niveau des plis inguinaux chez la souris nude. De par notre expérience, nous espérons obtenir un taux de prise au maximum d'environ 30 % pour l'ensemble des tumeurs greffées et nous envisagerons de faire un maintien de ces tumeurs chez la souris pendant 3 passages afin d'évaluer la stabilité moléculaire par rapport à la tumeur d'origine (soit une quarantaine de souris pour l'ensemble des tumeurs par an). A la suite de cette évaluation, nous envisagerons la congélation des fragments tumoraux (réduction) ou en discussion avec nos partenaires, nous déciderons du maintien de ces tumeurs chez la souris nude en vue d'évaluer de nouvelles thérapies qui feront l'objet d'une demande complémentaire d'autorisation d'expérimenter sur l'animal. Ce projet devrait nécessiter l'utilisation de 120 souris sur 3 ans soit 40 animaux/an au maximum. Les animaux seront euthanasiés dès que l'un des points suivant sera atteint (raffinement) (perte de poids > 10-15%, isolement, dos voûté, tumeur ayant atteint un volume équivalent à 1500 mm<sup>3</sup>, tumeur ayant un aspect ulcéré ou nécrosé).

6958. Le projet, d'une durée de 5 ans, consiste à caractériser l'impact du stress maternel anténatal sur le système nociceptif. A ce jour, très peu de données sont disponibles même si cette question se révèle particulièrement importante dans la prise en charge de ces nouveau-nés. Chez l'humain, les données épidémiologiques disponibles montrent que les enfants et adultes issus de telles gestations difficiles présentent un risque élevé de développer des pathologies chroniques affectant le fonctionnement cérébral normal. Aucune méthode non animale n'existe pour étudier plus avant l'impact de ce stress maternel. Le modèle animal choisi pour ce travail est celui de souriceaux de souche C57Bl6/J dont les mères ont été soumises à un stress de contention dans la dernière semaine de gestation selon un protocole bien documenté. Le travail comportera plusieurs études visant (1) à analyser le comportement nociceptif lors du développement postnatal, et leur sensibilité analgésique à la morphine à l'âge adulte, (2) à caractériser l'intégration nociceptive thalamique et sa modulation par la morphine et (3) à identifier des marqueurs épigénétiques permettant d'envisager une approche de "sauvetage" à l'aide des traitements disponibles ou en cours de développement. Pour tenir compte de la règle des 3R, notre étude portera sur les portées dans leur ensemble en tenant compte d'un effet sexe-spécifique qui est suspecté dans la littérature existante. Les portées seront maintenues avec leur mère jusqu'au sevrage et les fratries, séparées selon le sexe, seront maintenues en cage collectives enrichies nids et bâtons pendant toute la durée des expérimentations. Un nombre de souris mâles et femelles égal à 465 est nécessaire pour réaliser l'étude soit environ 42 portées viables issues d'un lot de 40 femelles et de 5 mâles reproducteurs. Le nombre d'animaux par lot a été estimé sur la base des analyses statistiques à réaliser et du seuil de significativité qu'elles requièrent. L'analyse comportementale longitudinale permet de réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum. De la même manière, les prélèvements de tissus pourront être réalisés sur les animaux n'ayant pas reçu de substances pharmacologiques lors de leur suivi de façon à étudier les mécanismes moléculaires des phénomènes observés.

6959. L'altération des interactions mère-enfant chez les enfants nés prématurés a une influence néfaste sur le développement de son système nerveux. Il est maintenant bien établi que l'enfant prématuré présente, arrivé à l'âge adulte, des réponses anormales au stress et à la douleur, un risque addictif élevé ainsi que pour le développement de pathologies chroniques. Parmi ces dernières, on trouve un risque majeur de présenter des troubles anxieux et dépressifs. De telles altérations sont bien modélisées chez le rongeur en imposant à la mère un stress psychosocial de séparation avec les nouveau-nés du 2<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> jour postnatal. L'objectif de ce projet est d'utiliser le modèle de séparation maternelle chez le rat Wistar pour tenter une stratégie de sauvetage des effets délétères observés. Celle-ci constituera en l'administration (1) d'inhibiteurs de l'inflammation chronique, (2) de molécules neuroprotectrices à effet anxiolytique et (3) de molécules préservant la qualité d'inhibition nerveuse. L'administration sera effectuée sur les nouveau-nés et sur la mère. Pour vérifier la portée du traitement pharmacologique, les réponses à la douleur ainsi que l'analgésie induite par un stress de nage seront mesurées chez ces animaux après sevrage.

Le projet utilisera 544 animaux nouveau-nés des deux sexes et sera effectué sur une durée maximum de 3 ans. 68 mères allaitantes seront également utilisées dans l'étude, dont certaines feront l'objet d'une stratégie de sauvetage pour contrecarrer les effets de la séparation maternelle. La règle des 3R sera suivie par le suivi longitudinal des animaux pendant la période postnatale qui permet de réduire le nombre d'animaux pour l'étude. Les jeunes rats seront hébergés en cage collectives, enrichies (nids + bâtons). Du fait de la nature du projet, aucune stratégie de remplacement n'a pu être mise en place.

6960. Il existe aujourd'hui plusieurs pathologies associées à des troubles du système lymphatique, comme l'augmentation de la clarté nuquale associée entre autre à la trisomie 21, ou bien des pathologies comme les lymphœdèmes. Les mécanismes impliqués dans le développement du système lymphatique sont à ce jour mal connus. Nous nous proposons donc d'étudier ces mécanismes.

Dans ces études, des embryons de souris seront utilisés afin d'analyser la formation des ganglions et du système lymphatique à des stades embryonnaires de E10.5 à E18,5, période pendant laquelle se met en place le système lymphatique.

Les embryons seront collectés à partir de souris gestantes de génotype sauvage ou mutant. Ces dernières portent des mutations spécifiques qui affectent le développement des ganglions lymphatiques et le développement de la vascularisation lymphatique. Les embryons seront analysés par des reconstitutions en 3D, de la cytométrie en flux et de l'histologie.

Ces études permettront de comprendre quelles sont les conditions requises pour l'initiation de la formation du système immunitaire à l'intérieur de l'embryon.

Règle des 3R :

De manière générale, nous utiliserons le minimum de souris nécessaires pour nos expérimentations. Pour cela, nous validerons l'effet thérapeutique de notre modèle par une approche statistique applicable à des échantillons de petites tailles : le test non paramétrique Mann-Whitney. 2055 souris seront utilisées pour ce projet.

Pour limiter la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées, les souris seront hébergées en accord avec la loi européenne dans une enceinte dédiée, dans des cages de dimension suffisante, avec un enrichissement comprenant des nids en carton et du coton. Une grille d'évaluation des points limites permettra d'effectuer un suivi du bien-être des animaux. Si les critères sévères sont atteints, telle qu'une perte de poids supérieure à 20% du poids initiale, les souris seront euthanasiées.

Le modèle animal semble ici essentiel car il permet d'étudier un système immunitaire proche de celui de l'homme. Les nombreux modèles disponibles permettent d'étudier des facteurs spécifiques, modifiables et qui peuvent être étudiés en détail, ce qui n'est pas possible sur des tissus humains.

6961. Notre institut garantit l'élevage des lignées génétiquement modifiées sous un statut SOPF. Par définition, ce type d'activité implique dans autre option possible l'utilisation d'animaux (remplacement). Pour le maintien de ce statut l'entrée des lignées nécessite, parfois, une décontamination par transfert d'embryons chez des souris mères-porteuses.

De plus, nous proposons aussi des prestations permettant la conservation et l'archivage des lignées murines. Ainsi nous cryopréserveons les lignées sous forme de sperme afin d'éviter le maintien inutile sous forme respirante des lignées et de redémarrer à tout moment en élevage en fonction des besoins scientifiques. Nous estimons réaliser en moyenne 45 prestations de décontamination par an et 34 prestations de cryopréservation. Le nombre de souris utilisés pour les prestations de décontamination par an est de 225 mâles et 450 femelles. Le nombre de souris utilisés pour les prestations d'archivage et cryopréservation est estimé à 68 mâles et 374 à 748 femelles par an. Soit un total pour le projet entre 1117 à 1491 souris par an pour l'ensemble des prestations. Soit pour 5 ans de projet l'utilisation de 5585 à 7455 souris. D'un point de vue pratique, le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet. Toute procédure stressante ou douloureuse sera réalisée sous anesthésie générale.

6962. Au cours des cinq dernières décennies, la sélection intensive a permis d'améliorer de façon spectaculaire les performances de production et d'efficacité alimentaire des poulets commerciaux. Cependant, cette évolution de performances s'est accompagnée d'une plus grande fragilité des animaux face aux agressions environnementales, notamment une plus grande sensibilité aux pathogènes. Cela pourrait être dû à une utilisation massive des ressources alimentaires ingérées par l'animal pour sa production, laissant ainsi une part plus faible des ressources pour les autres fonctions, telles que la fonction immunitaire. Ce phénomène est appelé « trade-off » ou allocation de ressources. Notre projet a pour objectif d'aborder cette hypothèse. Il vise à comprendre les relations détaillées entre caractères de production et paramètres immunologiques en comparant la robustesse face à des infections virales respiratoires, de poulets sélectionnés sur des caractères spécifiques, soit de production, soit de réponse immunitaire. Dans une première étude, nous avons déterminé l'impact de la sélection pour l'efficacité digestive/alimentaire sur la sensibilité au virus influenza aviaire. Pour cela, des poulets type chair ou type pondeuse, sélectionnés de façon divergente pour l'efficacité digestive/alimentaire, ont été infectés par un virus influenza aviaire faiblement pathogène de sous type H7N1. La réplication virale, la physiopathologie et la réponse immunitaire sont en cours d'analyses. Dans le présent projet, nous voulons étudier cette fois-ci l'impact de la sélection pour l'immunité sur le caractère de robustesse défini par la sensibilité/résistance aux virus respiratoires. Pour ce faire, nous bénéficions d'un modèle animal original, à savoir des poulets type pondeuse sélectionnés initialement sur la réponse humorale au vaccin inactivé contre virus de la maladie de Newcastle et des poulets de la lignée d'origine non sélectionnée. L'étude de la sensibilité/résistance aux virus influenza aviaries et de la maladie de Newcastle permettra de décrypter les différences de réponse au niveau de l'immunité innée alors que la réponse humorale vaccinale définit une capacité de réponse immunitaire adaptative. Un total de 136 poulets de ces deux souches sera infecté par le virus influenza aviaire H7N1 et le NDV souche lentogénique La Sota. Les paramètres étudiés chez les poulets seront la quantité de virus dans les voies aériennes, les courbes de survie le cas échéant, les lésions histologiques dans le poumon et la réponse immunitaire dans le poumon et la rate. Remplacement : Aucun modèle *in vitro* ne permet d'évaluer ce caractère phénotypique qui ne s'applique qu'à un organisme entier (résistance de l'animal à une infection virale). Réduction : Pour chaque virus d'épreuve, l'expérimentation comparera 12 animaux inoculés à 5 animaux contrôles (soit  $17 \times 2 = 34$  animaux par expérimentation). Si les deux lignées se distinguent notablement par leur résistance à l'infection, nous devrions observer de grandes différences dans (i) les taux de mortalité et (ii) la charge virale dans les poumons. Notre expérience passée avec ce virus influenza dans deux autres lignées de poulets (taux de mortalités observés : 0% contre 30 à 40%) nous a permis de prédire une puissance d'au moins 80% avec ces effectifs de 12 (Calcul de la puissance pour un test de comparaison de proportions, seuil 5%, *Anastats*). Raffinement : Au cours de l'infection expérimentale les animaux seront observés au moins 3 fois par jour. Tous les animaux seront introduits à 1 jour d'âge (pour éviter toute contamination extérieure à

l'expérimentation, soit par du virus influenza aviaire, soit par un virus de la maladie de Newcastle) et gardés dans des isolateurs climatisés. Des jouets suspendus seront fournis pour l'enrichissement comportemental.

6963. Suite à une blessure ou un accident, il se peut qu'une perte rapide et massive de sang (dont la fonction principale est le transport de l'oxygène entre les poumons et les organes) entraîne un état où les organes ne reçoivent plus assez d'oxygène. Cet état s'appelle un état de choc hémorragique. Il est causé d'une part par la perte des globules rouges qui transportent l'oxygène mais aussi et surtout par la diminution du volume de sang circulant, entraînant la chute de la pression artérielle. Un autre effet de cette perte de sang est la perte des facteurs de coagulation qui permettent au sang de coaguler et de réparer les plaies.

Pour éviter l'apparition de cet état, ou tout du moins diminuer ses effets, deux actions doivent être entreprises rapidement : l'arrêt de l'hémorragie et le remplacement du volume de sang perdu afin de restaurer une pression suffisante dans les vaisseaux sanguins. En situation difficile ou isolée, ou lors de catastrophes, l'accès à un hôpital pour y recevoir les soins chirurgicaux et médicaux adaptés peut être difficile et long pour le blessé. Ainsi, il peut être nécessaire d'utiliser des substituts au sang pour remplacer le volume perdu. Parmi les produits disponibles, aucun ne permet de remplacer les globules rouges qui transportent l'oxygène, mais certains permettent de remplacer la volémie (c'est à dire de remplir) et d'apporter les facteurs de coagulation. C'est le cas notamment du plasma lyophilisé (PLYO). En plus des avantages propres à son mode de conservation (lyophilisation), le PLYO présente la particularité de pouvoir être concentré lors de sa reconstitution. L'intérêt de concentrer le plasma est d'apporter un maximum de facteurs de coagulation, tout en limitant le volume de remplissage afin de ne pas faire trop augmenter la pression artérielle avant la prise en charge chirurgicale des hémorragies (trop faire augmenter la pression artérielle pourrait faire ressaigner les plaies). Lors de précédentes études sur animal, le PLYO « concentré » a déjà montré une innocuité, mais le taux optimal de concentration permettant la meilleure efficacité de remplissage sans occasionner de complication reste à définir. Le but de cette étude est de définir le meilleur taux de concentration du PLYO pour une utilisation chez le patient polytraumatisé hémorragique en pré-hospitalier en fonction de critères médicaux objectifs tels que l'importance de l'inflammation systémique, le risque de surcharge vasculaire, les changements de la coagulation et l'efficacité du remplissage vasculaire.

L'utilisation d'animaux est ici inévitable du fait de l'importance et du grand nombre des données biologiques et physiologiques recueillies. Ainsi, le remplacement n'est donc pas possible. La production d'un plan d'expérimentation précis ainsi que d'un suivi en temps réel des données permettront de réduire le nombre d'animaux inclus, soit au maximum 48 porcs. Enfin, afin de maximiser l'utilité de chaque animal et dans un but de raffinement, cette étude conduite sous anesthésie et sans réveil, permettra de recueillir un ensemble complet de paramètres et une portion des échantillons biologiques prélevés sera conservée pour de potentielles futures études.

6964. Le pancréas joue un rôle clef dans l'homéostasie nutritionnelle par la synthèse et la sécrétion d'hormones et d'enzymes. Cet organe inclut des cellules endocrines et exocrines. Le pancréas exocrine se compose de cellules acinaires et canalaire, alors que les cellules endocrines sont regroupées en des îlots de Langerhans. Ces derniers correspondent à des micro-organes spécialisés composés de quatre différents types de cellules : alpha, bêta, delta, et PP produisant les hormones glucagon, insuline, somatostatine et PP (polypeptide pancréatique), respectivement. L'insuline et le glucagon fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler l'homéostasie du glucose (ou glycémie), alors que la somatostatine et PP régulent la sécrétion d'autres hormones et d'enzymes exocrines.

Comprendre comment les cellules bêta sont générés au cours du développement, mais aussi à l'âge adulte, est une condition préalable à la conception de nouvelles thérapies de régénération cellulaire dans le contexte de la recherche sur les diabètes de type 1 type 2, deux maladies résultant in fine en la perte ou diminution importante du nombre de cellules bêta. Spécifiquement, notre recherche se concentre sur le diabète de type 1, une maladie auto-immune qui se caractérise par la perte sélective de cellules bêta. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, ou même la mort. Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée.

Ainsi, d'autres alternatives doivent être développés afin de traiter efficacement les conséquences du diabète. Nous avons identifié une série de gènes dont l'activité est associée à la régénération de cellule productrice d'insuline dans le pancréas. La compréhension des mécanismes par lesquels cette régénération opère, permettrait d'envisager à terme de soigner, voire de guérir certaines formes de diabète chez l'humain. Afin de mieux caractériser les effets des gènes concernés dans le pancréas, nous avons généré des animaux aboutissant à une perte de fonction de certains de ces gènes spécifiquement dans le pancréas. L'objectif de ce projet est d'utiliser ces modèles pour caractériser les mécanismes d'action d'un gène qui pourrait représenter une cible d'intérêt pour le traitement du diabète.

Nous prévoyons d'utiliser 864 souris pour l'ensemble de ce projet qui répond aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : les effets métaboliques analysés sur le long terme requièrent un système biologique intégré tel qu'un organisme vivant. Ceci ne peut malheureusement pas être modélisé *in vitro*.

Réduction : Nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables et sans prévoir répétition des expériences.

Raffinement : Aucun des animaux utilisés dans ce projet ne présente de phénotype dommageable. Durant toute la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille de score permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances, et de mettre en œuvre des points limites précoces et adaptés. En amont de la procédure, des dispositions (habitation) sont prises pour minimiser tout stress aux animaux.

6965. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une maladie maligne qui représente 25 % du total des leucémies. Il s'agit de la malignité lymphoïde la plus fréquente dans les pays occidentaux et aujourd'hui il n'est pas encore possible de guérir de la LLC. Elle se caractérise par une évolution clinique et un pronostic très variables. Certains patients peuvent n'éprouver que des symptômes minimes ou pas de symptômes du tout durant de nombreuses années et avoir une espérance de vie normale, sans nécessiter de traitement. D'autres personnes sont déjà symptomatiques au moment du diagnostic, ou le deviennent rapidement après, et sont sujets à des complications infectieuses et auto-immunes qui réduisent leur espérance de vie.

Le traitement standard comprend une chimiothérapie avec un ou plusieurs agents. On peut également utiliser des anticorps monoclonaux, en particulier du rituximab, seul ou en combinaison dans le cadre d'une chimiothérapie. Dans la plupart des cas, la chimiothérapie affecte à la fois les cellules de tissus normaux et les cellules de LLC alors que le traitement par anticorps monoclonal peut affecter certains lymphocytes normaux, mais épargner la plupart des autres cellules. Autre avantage du rituximab, c'est un traitement qui stimule ou rétablit la capacité de votre système immunitaire à lutter contre la maladie et les infections. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité immunostimulatrice de deux composés en combinaison au rituximab afin d'évaluer le bénéfice thérapeutique dans un modèle de leucémie xenogreffée chez la souris C57BL/6. Pour ce faire nous utiliserons 64 souris C57BL/6, au préalable greffées par une leucémie murine exprimant l'antigène CD20 humain, qui seront scindées en 8 groupes de 8 souris afin d'avoir tous les contrôles nécessaires. L'analyse de l'activité immunostimulatrice de ces deux composés sur les cellules du système immunitaire est un phénomène complexe (niveau moléculaire et cellulaire) qui ne peut se faire que sur un mammifère vivant et elle ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*. Pour cette étude pilote, le nombre d'animaux (8 souris x 8 groupes) répond aux exigences de la réglementation qui préconise d'utiliser un nombre d'animaux limité (principe de réduction). En accord avec le principe de raffinement, une attention particulière sera portée aux conditions d'hébergement des animaux afin d'améliorer leur bien-être. Les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'anxiété des animaux en assurant des soins et une médication appropriée.

6966. L'objectif principal de notre équipe est de développer de nouveaux traitements contre le cancer. La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains. Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps entiers, fragments, Affitins, liposomes, etc...), de plusieurs ligands et de plusieurs radioéléments. Cette autorisation nous permettra de continuer et d'approfondir les travaux déjà réalisés par notre équipe qui avaient reçu l'agrément de notre comité d'éthique. Notre travail consiste donc à choisir le meilleur radiopharmaceutique pour une pathologie donnée. Les objectifs de ce projet sont de répondre à 3 questions :

Question A : Définir le vecteur F(ab')<sub>2</sub> recombinant le mieux adapté à la Radioimmunothérapie (RIT) du cancer sur 2 lignées tumorales CD138 +. 3 vecteurs seront testés,

Question B : Pharmacocinétique et biodistribution du meilleur vecteur radiomarqué à l'Astate-211 et au Lutécium-177 pour la RIT

Question C : Peut-on masquer les sites CD138 hépatiques avec une dose de charge d'anticorps froid ?

Ces biodistributions nous permettront de choisir le meilleur vecteur et le meilleur complexe pour les thérapies, celui qui donnera une bonne fixation à la tumeur et une faible fixation aux organes vitaux (amélioration du rapport signal sur bruit). Il faudra 384 souris pour ces études. Biodistributions : nos études suivent le même protocole. Le système vecteur- ligand-radioélément est d'abord testé sur des cellules tumorales en culture. Quand l'efficacité est démontrée, les cellules tumorales sont greffées à des souris. Le système vecteur- ligand-radioélément est injecté aux souris porteuses de tumeurs pour étudier la distribution dans un organisme vivant, la fixation du radioélément sur la tumeur et tous les organes. La mise en œuvre de nos protocoles nécessite un calendrier contraint de production de radioéléments et de préparation du radiopharmaceutique afin de réaliser nos expérimentations. La difficulté que nous rencontrons lors de ces expériences qui nécessitent une forte activité d'isotopes radioactifs, est de concilier le bien être de l'animal et la protection des manipulateurs. Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme. Règle des 3R : Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests *in vitro* sur les cellules tumorales. Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie. Diminuer le nombre d'animaux nécessaires à nos études en développant l'imagerie pour les études de suivi thérapeutique.

6967. Certaines maladies sont liées à un mauvais fonctionnement du système immunitaire : il ne peut plus assurer la défense de l'organisme (déficit immunitaire) ou alors il se retourne contre lui (maladie auto-immune). Ou alors, d'autres maladies (cancers) ne sont pas reconnues comme un danger par le système immunitaire qui les laisse se développer. Les immunoglobulines spécifiques ou polyvalentes (protéines humaines plasmatiques ou recombinantes) permettent la prise en charges de ces maladies graves. Leur administration permet de stimuler le système immunitaire ou de le réguler. Dans le cadre du développement de tels médicaments, l'étude de leur devenir dans l'organisme (pharmacocinétique) est indispensable. La pharmacocinétique permet entre autres de :

- Sélectionner entre différentes formulations celles qui maintiennent le médicament plus longtemps dans l'organisme.

- Sélectionner entre différents médicaments candidats celui qui reste le plus longtemps en circulation.
- Lors d'un changement de procédé de fabrication, s'assurer que ce changement n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique du médicament.
- Sélectionner la meilleure voie d'administration (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale,..).
- Adapter les posologies de traitement aussi bien dans les modèles d'efficacité chez l'animal que dans les essais cliniques chez l'homme.

Ces études indispensables font appel à des modèles animaux. Elles sont réglementairement requises avant utilisation de la nouvelle molécule dans un essai clinique chez l'homme et ne peuvent donc pas être remplacées par des études *in vitro*.

L'objectif de ce projet est d'étudier le profil pharmacocinétique des immunoglobulines humaines après administration unique par injection (voie parentérale) chez des rongeurs. La nouvelle molécule est administrée chez l'animal par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire et des prélèvements sont effectués à différents temps afin de déterminer si la molécule reste longtemps en circulation ou si elle est éliminée rapidement, quelle est sa concentration maximale, quelle est l'exposition totale de l'animal à la molécule, etc. Le projet prévoit le recours à un minimum nécessaire de 1695 animaux sur 3 ans, tous nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Ils sont hébergés en groupe, selon les règles en vigueur de l'animalerie avec un enrichissement de milieu obligatoire pour tous. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre. Par exemple, des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque injection ou prélèvement. Des critères d'arrêt ont été définis et validés par une équipe vétérinaire.

6968. Le cancer du pancréas avec près de 10000 nouveaux cas par an, est l'un des cancers les plus graves, avec une espérance de survie à 5 ans très faible (inférieure à 5%). A l'heure actuelle, la chirurgie reste le meilleur traitement possible pour les 15 à 20 % de patients dont la tumeur est opérable. Et bien que certains protocoles de chimiothérapie aient permis une amélioration de la durée et de la qualité de vie des patients, le traitement de ce cancer reste un enjeu majeur des recherches en oncologie. S'il est maintenant clairement établi que certaines cellules du microenvironnement influencent la tumorigenèse et la progression tumorale, le rôle des cellules nerveuses et notamment des fibres nerveuses infiltrant les tumeurs restent mal comprises. Nous proposons donc d'étudier l'influence du système nerveux et plus particulièrement de l'axonogenèse (innervation des tumeurs) dans le développement des tumeurs pancréatiques. Ce projet explore donc une nouvelle voie afin de lutter contre la progression tumorale. Les différentes procédures utilisées dans ce projet nous permettront : 1/ de décrire l'innervation des tumeurs, 2/ de définir le rôle au sein des tumeurs des différents types d'innervation du pancréas par des expériences de dénervations, 3/ d'identifier les molécules impliquées dans le lien entre projections nerveuses et les tumeurs par la caractérisation moléculaire des neurones. Ces données sont importantes, elles pourraient à terme permettre de contribuer à l'identification d'indicateurs pronostiques pour les patients et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de mettre au point de nouveaux traitements.

La qualité de notre plan expérimental ainsi que l'étude détaillée du nombre d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat scientifique valable nous permettent d'optimiser le nombre d'animaux utilisés et de suivre la règle des 3R. Ainsi ce projet utilisera 256 souris sauvages et 1362 souris génétiquement modifiées soit 1618 souris au total.

Notre projet nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, les études *in vitro* ne permettent pas de récapituler l'ensemble des interactions cellulaires existantes lors du développement des tumeurs. Par ailleurs, les animaux génétiquement modifiés représentent des atouts pertinents pour obtenir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les maladies humaines. En particulier, ils fournissent des modèles de tumeurs pancréatiques qui sont décrits pour récapituler les différentes étapes du développement de la pathologie.

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

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

6969. Pour une meilleure prise en charge de maladies graves (hémophilie, cancer, maladies auto-immunes,...), des médicaments plus efficaces et plus spécifiques doivent être développés tout en cherchant à minimiser les effets secondaires chez les patients. La caractérisation *in vitro* et *in vivo* (chez l'animal puis chez l'homme) de ces nouvelles molécules est indispensable pour démontrer leur efficacité et comprendre leur mécanisme d'action, étudier leurs propriétés pharmacocinétiques et évaluer leur toxicité.

Pour ces caractérisations, des dosages avec de nouveaux réactifs spécifiques à la protéine thérapeutique en développement (facteurs de la coagulation, immunoglobulines polyvalentes, ou anticorps monoclonaux) doivent être générés. Ces réactifs permettront le dosage dans le plasma animal ou humain de cette molécule (pharmacocinétique) ou des anticorps anti-molécule (immunogénicité/toxicité), le dosage *in vitro* de l'activité fonctionnelle de la molécule (mécanisme d'action) ou encore, le dosage des impuretés dans le produit (toxicité)... Les anticorps dirigés spécifiquement contre la molécule thérapeutique ou les impuretés sont souvent de très bons réactifs. Ils sont couramment utilisés pour ces applications et leur production requiert obligatoirement l'immunisation d'animaux. En effet, eux seuls peuvent induire une réponse multiple à un antigène et ainsi générer des anticorps avec différentes affinités.



L'immunisation consiste à administrer par voie sous-cutanée la molécule thérapeutique (ou les impuretés) contre laquelle nous voulons obtenir des anticorps afin de pouvoir la doser. L'objectif est l'obtention d'un immun-sérum riche en anticorps spécifiques contre la molécule thérapeutique recherchée.

Le nombre d'animaux requis durant le projet est de 108 animaux (lapins et rongeurs) sur une durée de 3 ans. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir la quantité suffisante d'immun-sérum pour mettre au point les dosages de caractérisation des nouveaux médicaments d'un point de vue de leur efficacité, pharmacocinétique et toxicité. Tous les animaux utilisés sont nés et élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Afin de garantir leur bien-être, les rongeurs sont élevés en groupe et le recours à l'anesthésie est pratiqué avant chaque prélèvement afin d'éviter les souffrances. Des critères d'arrêt ont été définis dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des interventions appropriées.

6970. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) à champ cyclique rapide (FFC-NMR) est une technologie émergente en physique. Son principe est d'étudier les phénomènes biologiques à des champs magnétiques très faibles sur des machines qui aujourd'hui sont à l'état de prototypes prometteurs. Le but de ce projet européen est de tester la sensibilité et l'utilité de cette nouvelle méthode pour l'étude de mécanismes moléculaires physiopathologiques, invisibles par la RMN standard. L'hypothèse émise est que la RMN à champ cyclique rapide peut aider à délimiter le tissu sain du tissu pathologique, et présenter un intérêt diagnostique. Cette étude permettra de tester la RMN à champ cyclique dans le contexte de l'étude des tumeurs cérébrales. En l'absence de modèle alternatif, l'utilisation de 318 souris Nude permettra de modéliser la complexité des tumeurs humaines et de fournir l'ensemble des tissus pour une analyse extensive. Nous espérons apporter grâce à la RMN à champ cyclique des informations plus précises sur la délimitation des tumeurs et sur leur hétérogénéité tissulaire. De plus, différents agents de contraste expérimentaux seront testés pour évaluer le gain de performance qu'ils peuvent apporter.

Tous les efforts seront faits par les expérimentateurs pour réduire le nombre d'animaux impliqués et toutes les expériences qui ont pu être entreprises préalablement *in vitro* ont déjà été faites. L'important recul du laboratoire sur les modèles animaux de tumeurs cérébrales permettra de surveiller attentivement d'éventuels signes de souffrance et de prodiguer tous les soins pour lutter efficacement contre.

6971. Les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales d'origine astrocytaire de très mauvais pronostic avec une survie médiane des patients à 15 mois après diagnostic. Le traitement actuel repose, lorsque cela est possible, sur une exérèse chirurgicale suivie de traitements de radio et/ou chimiothérapie. En dépit de nombreux efforts de recherche ces dernières décennies, force est de constater que la stratégie thérapeutique est en échec. De récents travaux de recherche ont permis la mise au point d'une nouvelle stratégie de traitement de ces tumeurs. Il a été montré que l'injection de nanoparticules magnétiques couplée à l'application d'un champ magnétique externe permet de faire osciller mécaniquement ces particules et d'engendrer la mort des cellules tumorales. Le présent projet propose de reprendre le socle de données disponibles et de compléter cette étude par l'ensemble des tests pré réglementaires permettant d'envisager le transfert de cette stratégie thérapeutique dans des modèles de gros animaux à court terme, puis chez l'Homme. L'utilisation de 112 souris immunodéficientes permettra de démontrer formellement l'efficacité thérapeutique de cette approche et l'absence d'effets secondaires. Cette étude sera conduite en adéquation avec la règle des 3R proposée par Russel et Burch. Aucun modèle ne permet à ce jour de remplacer l'utilisation d'animaux vivants pour répondre aux questions qui sont posées ici. L'important recul du laboratoire sur les modèles expérimentaux de tumeurs cérébrales permet d'identifier et de prendre en charge efficacement la souffrance éventuelle par l'utilisation d'analgésiques adaptés. Par ailleurs, tous les tests pouvant être réalisés *in vitro* ont été faits pour réduire le nombre de conditions expérimentales et tous les efforts sont faits pour minimiser le nombre d'animaux par lots sans compromettre la validité des résultats.

6972. Le glioblastome multiforme est une tumeur cérébrale de sombre pronostic. En dépit de nombreux efforts de recherche ces dernières années, la stratégie thérapeutique est en échec avec une survie médiane des patients à 15 mois après le diagnostic. Plusieurs modèles animaux de cette pathologie sont disponibles et reposent sur l'utilisation de lignées de cellules qui ont été établies depuis plusieurs décennies dans les laboratoires du monde entier. Du fait de cette longue histoire, les lignées cellulaires ont acquis de nombreuses mutations génétiques qui les ont fait dériver et les éloignent aujourd'hui de la réalité clinique. Les travaux du laboratoire sont concentrés sur l'établissement de nouvelles cultures de cellules tumorales, issues de biopsies de patients ou de pièces chirurgicales, on parle de cultures primaires. Ces cultures autorisent une analyse des anomalies moléculaires associées au glioblastome multiforme qui ont un plus fort potentiel pour la compréhension de cette pathologie et l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques. Récemment, une culture primaire a été établie *in vitro* et plusieurs drogues ont été testées afin d'en stopper la prolifération, processus clé de la cancérogenèse. L'utilisation de 24 souris immunodéficientes dans ce projet doit permettre de vérifier que la culture native induit la formation d'une tumeur (reproduisant ainsi la pathologie humaine), tandis que la culture traitée n'engendre pas la formation d'une tumeur. L'utilisation de 6 souris par groupe expérimentale constitue le minimum d'animaux pour l'obtention de résultats significatifs. Tous les efforts sont faits par les expérimentateurs pour réduire le nombre d'animaux impliqués et toutes les expériences qui ont pu être entreprises préalablement *in vitro* ont été faites. En l'absence d'un modèle alternatif, nous proposons de conclure cette étude par le présent projet. L'important recul du laboratoire sur les modèles animaux de tumeurs cérébrales permettra de surveiller attentivement d'éventuels signes de souffrance et de prodiguer tous les soins pour lutter efficacement contre.

6973. Production *in vivo* d'un anticorps monoclonal dirigé contre des leucocytes ayant une action délétère lors du remodelage cardiaque suite à un infarctus du myocarde : Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées. L'infarctus du myocarde, communément appelé crise cardiaque, correspond à la destruction partielle du muscle cardiaque. Il s'agit d'une situation d'extrême urgence qui nécessite une hospitalisation immédiate. Selon des données OMS, sur 50 millions de décès annuels dans le monde, les cardiopathies ischémiques sont la première cause de décès avec 7,2 millions de décès d'origine coronaire, dont 1,8 millions en Europe. En France, son incidence reste encore élevée 120 000 cas par an et est responsable de 10 à 12% de la mortalité totale annuelle chez l'adulte.

L'infarctus du myocarde est déclenché par l'obstruction d'une artère qui alimente le cœur en sang et donc en oxygène (artère coronaire). Privées d'oxygène, les cellules musculaires du cœur meurent rapidement sur une zone plus ou moins étendue. Cela entraîne des problèmes de contraction du muscle cardiaque (myocarde), se manifestant par des troubles du rythme, une insuffisance cardiaque, voire l'arrêt du cœur. A la phase aiguë d'un infarctus du myocarde, une reperfusion précoce est la stratégie la plus efficace pour réduire la taille de la zone infarctée. La corrélation qui existe entre la durée de la période d'ischémie myocardique, la taille de la zone infarctée et le pronostic est connue depuis les années 1970, ce qui a conduit au développement des stratégies actuelles de prise en charge basées sur la rapidité de mise en œuvre des stratégies de reperfusion coronaire. Les améliorations thérapeutiques doivent donc désormais se focaliser sur les phases qui succèdent à l'ischémie, soit immédiatement après celle-ci, lors de la reperfusion, soit plus à distance, lors du remodelage ventriculaire. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses avancées ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu lors de la cicatrisation myocardique. Dès la phase initiale de l'infarctus, la nécrose massive de cardiomyocytes initie une réponse inflammatoire intense mettant en jeu au premier plan le système immunitaire. Au cours des 30 dernières années, de nombreux travaux expérimentaux suggèrent que cette réponse immunitaire, bien que nécessaire à la constitution d'une cicatrice fibreuse, va également aggraver l'étendue des lésions et accentuer le remodelage ventriculaire mal-adaptatif. Parmi les différents acteurs de cette réponse immunitaire, une équipe de recherche publique a identifié un rôle pathogène des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Ces premières données ont fait l'objet d'un dépôt de brevet national et international.

La poursuite de cette étude nécessite la production d'anticorps capable de cibler spécifiquement un antigène présent à la surface de la sous population ciblée. Un hybridome a été développé, sécrétant un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique de cette protéine spécifique à cette sous population lymphocytaire. Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production *in vivo* par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ce Mab n'a pu être caractérisé techniquement et validé cliniquement que sur des lots issus de production en condition *in vivo*. Des essais très poussés ont été menés pour tenter le transfert de cette production en condition *in vitro* (bioréacteur). Les niveaux de production en bioréacteur ne sont pas suffisants pour envisager la poursuite de cette étude. Par conséquent, les besoins liés à la poursuite de cette étude scientifique et son potentiel apport sur la santé publique imposent, en l'absence de solution alternative, le maintien de la production de cet anticorps monoclonal en condition *in vivo*. Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 1350 (10 et 1340). Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux. Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis de nombreuses années, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal. L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée soit par une technique éthiquement acceptable (asphyxie par saturation progressive en CO<sub>2</sub>), soit par élongation.

6974. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées. Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps polyclonaux est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps) ;
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps ;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps ;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La production d'anticorps polyclonaux chez le cobaye est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une faible quantité en antigène est disponible, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. De plus, elle permet aux différentes équipes de recherche de disposer d'un outil complémentaire aux anticorps produits par d'autres espèces. Le temps minimum d'immunisation est de 120 jours. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 protocoles, représentant 150 cobayes.

Dans la production d'anticorps polyclonaux, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine d'une semaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation. Les cobayes sont hébergés en groupe dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur socialisation.

6975. 12 millions de personnes dans le monde souffrent d'un désordre moteur appelé spasticité. Il s'agit de contractions exagérées d'un muscle entraînant des troubles des mouvements et/ou de posture qui peuvent être chroniques et douloureux. Ainsi tout mouvement locomoteur devient difficile voire impossible, les conséquences en sont très invalidantes et peuvent aller jusqu'à la mise en danger de la vie des personnes. La spasticité est présente au cours de nombreuses maladies neurologiques telles que l'accident vasculaire cérébral, la sclérose en plaques, la lésion de la moelle épinière ou le traumatisme crânien. Sa prise en charge médicale repose sur des traitements dont l'objectif est soit de provoquer la relaxation musculaire, soit d'empêcher la stimulation du muscle par le nerf. Ainsi, les médecins utilisent les myorelaxants comme le baclofène ou le dantrolène mais leur niveau d'efficacité reste faible. Les patients peuvent aussi être pris en charge par l'utilisation de la toxine botulique. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé régulièrement. Des recherches sont donc faites pour améliorer l'efficacité, la puissance, la rapidité et la durée d'action de ces traitements. Après une évaluation *in vitro* des nouvelles molécules, les plus prometteuses sont testées, dans ce projet, chez le rongeur afin de valider leur efficacité et leur sécurité d'utilisation. Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet de diverses molécules sur l'activité musculaire en utilisant 3 différentes méthodes complémentaires, largement décrites et utilisées : quantification de l'écartement spontané des doigts, la répartition du poids de l'animal sur ses pattes lors de ses déplacements libres et l'activité électrique musculaire selon une méthode proche de celle utilisée chez l'homme.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (travail sous anesthésie gazeuse, méthode de manipulations adaptées, nombre et durée des tests optimisés), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. En nous basant sur les données historiques obtenues avec les différents tests réalisés, le nombre d'animaux par groupe a été fixé à 7. Une étude comporte généralement 1 groupe contrôle, 3 groupes traités par des doses différentes du produit à tester. Un nombre de 560 rats et 560 souris est prévu pour ce projet sur une période de 5 ans.

6976. Les tests de génotoxicité sont réalisés dans le cadre de l'évaluation du risque toxicologique des substances pharmaceutiques, chimiques, phytosanitaires. Les résultats sont destinés à générer des données sur le produit à étudier avant d'entreprendre des études de toxicologie (plus longues et nécessitant plus d'animaux) obligatoires afin d'établir les dossiers de demande d'autorisation à fournir aux autorités d'enregistrement. Les tests de génotoxicité pratiqués *in vivo* chez des mammifères (rats, souris ou hamsters) ont pour but de détecter des aberrations géniques ou chromosomiques (structurelles et/ou numériques) résultant de l'action d'une substance d'essai. Plusieurs tests de génotoxicités sont validés et utilisés. Ils ont chacun une ligne directrice, un SPSF (*Standard project submission form*) en cours confirmant que la démarche de développement d'une ligne directrice est engagée ou des recommandations issues de la littérature. Parmi ceux-ci, on trouve :

1-Test de micronoyaux au niveau de la moelle osseuse est pratiqué *in vivo* chez des mammifères (rat souris hamster), en vue de détecter des aberrations chromosomiques structurelles et/ou numériques (*i.e.* end-points) et résultant de l'action d'une substance d'essai. Il est basé sur l'analyse de cellules (érythrocytes polychromatophiles) de la moelle osseuse. Il a pour but de détecter des substances qui engendrent des lésions cytogénétiques sous forme de micronoyaux issus d'un/des fragment(s) de chromosomes ou un/des chromosome(s) entier(s). Le Test du micronoyau *in vivo* a une ligne directrice OCDE (474) pour la moelle osseuse.

2-Test de micronoyaux au niveau du colon est pratiqué *in vivo* chez des mammifères, en vue de détecter des aberrations chromosomiques structurelles et/ou numériques et résultantes de l'action d'une substance d'essai. Il est basé sur l'analyse de coupes histologiques de colons. Il a pour but de détecter des substances qui engendrent des lésions cytogénétiques sous forme de micronoyaux issus d'un/des fragment(s) de chromosomes ou un/des chromosome(s) entier(s). Si le test du micronoyau *in vivo* au niveau de la moelle osseuse a une ligne directrice OCDE (474) concernant le test au niveau du colon il est réalisé selon de nombreuses publications et workshops

3-Test des comètes : recherche d'induction de lésions primaires de l'ADN telles que des cassures double et/ou simple brin, des sites alcali-labiles, des pontages. Le Test des comètes *in vivo* a une ligne directrice OCDE (489).

4-Le test de mutation au niveau du gène Pig-A est pratiqué *in vivo* chez le rongeur (rats ou souris), en vue de détecter des mutations géniques au niveau des hématies et des réticulocytes circulants résultant de l'action d'une substance d'essai. Il est basé sur l'analyse en cytométrie en flux de ces éléments circulants. Il fait l'objet d'un SPSF.

Chacun des tests peuvent être couplés entre eux afin d'étudier plusieurs end-points (mutation géniques, aberrations chromosomique, lésions primaires) sur les mêmes animaux, ceci afin de respecter la règle des 3R.

Selon les recommandations des lignes directrices, de la littérature ou de SPSF, une substance est testée à différents niveaux de dose (au moins 3) sur des groupes de 5 animaux. Des groupes de 5 animaux traités par le véhicule de la substance d'essai et par une (des) substance(s) de référence positives (choisies selon le end-point) sont inclus. En l'absence de différence entre mâles et femelles quant à la toxicité et/ou la métabolisation du produit à tester, un seul genre sera étudié. Ceci permet d'utiliser le moins d'animaux possible (5 animaux par groupe, 3 groupes traités par l'élément d'essai, 1 groupe traité par le véhicule et 1 à 3 groupes traités par une substance positive de référence, 35 animaux maximum par étude). Le projet sur 5 ans utilisera, pour 5 études par an, 1750 animaux si les 2 sexes sont étudiés et que 3 tests sont couplés (*ex.* test pig-A, test du micronoyau sur moelle osseuse et test des comètes, nécessitant au total 3 groupes témoins positifs). Il n'existe aucune méthode alternative réglementaire à l'utilisation des animaux pour ces types d'évaluation toxicologique. Les animaux sont stabulés et manipulés dans le calme, à distance des autres animaux dans une salle indépendante (y compris euthanasies). Après traitement, il y a un suivi comportemental et pondéral des animaux. Tout animal montrant des signes cliniques modérés à intenses fera l'objet d'une euthanasie. Les animaux sont observés très fréquemment après traitement, une fois pendant les 30 premières minutes suivant l'administration de la substance et régulièrement pendant les premières 24 heures, avec une attention particulière au cours des 4 premières heures ; l'observation est ensuite quotidienne, pendant 14 jours. Toutefois, la durée d'observation n'est pas fixée de manière rigide. Elle est fonction des réactions de toxicité, du moment où elles apparaissent et de la durée de la période de récupération. Elle peut donc être prolongée, si nécessaire, à 21 ou 28 jours. Les observations portent en particulier sur les modifications de la peau, des poils, des yeux et des muqueuses, ainsi que de l'appareil respiratoire, du système circulatoire, du système nerveux central et autonome, de l'activité somato-motrice et du comportement. L'attention porte en particulier sur l'observation des diverses manifestations de tremblement, convulsion, salivation, diarrhée, léthargie, sommeil et coma. Les animaux souffrant manifestement ou présentant des signes graves de détresse sont euthanasiés (Asphyxie au CO<sub>2</sub> (concentration : > à 70%) en cas de signes cliniques modérés ou intenses, ou perte de poids importante (>20%).

6977. L'objectif de ce projet est de permettre l'évaluation des effets de candidats médicaments sur les fonctions vitales de l'organisme (cardiovasculaire, respiratoire et système nerveux central) chez le chien ou le mini-porc conscient. Ces études, dites de pharmacologie de sécurité, sont réalisées dans un cadre réglementaire en accord avec les recommandations ICH S7A, ICH S7B, ICH S6, ICH S9 et ICH M3 (R2). Par conséquent, par respect de ce cadre réglementaire, aucune méthode non animale ne peut être utilisée. La réalisation de ces études est un préalable aux premiers essais cliniques chez l'homme.

Les effets pharmacodynamiques indésirables d'une substance sur les fonctions physiologiques sont évalués en relation avec une exposition à des doses supérieures ou égales aux doses thérapeutiques, en se basant sur deux approches :

- l'utilisation de la télémétrie interne pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire chez le chien ou le mini-porc conscient.
- l'utilisation de la télémétrie externe pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et respiratoire chez le chien ou le mini-porc conscient.

La fonction du système nerveux central est réalisée par le biais d'une batterie de tests fonctionnels (FOB) chez des animaux équipés en télémétrie interne ou externe. En fonction de la nature du candidat médicament (nouvelle entité chimique, produit biologique ou anticancéreux), les études de pharmacologie de sécurité peuvent être soit réalisées sous forme d'études autonomes, soit intégrées dans les études de toxicologie réglementaire. Dans le cadre des nouvelles entités chimiques, des études de pharmacologie de sécurité autonomes sont requises (ICH S7A et ICH S7B). Les animaux sont généralement équipés d'émetteurs télémétriques implantés. Ces émetteurs transmettent par onde radio les signaux cardiovasculaires vitaux tels la pression artérielle, l'électrocardiogramme, la pression ventriculaire gauche ainsi que la température ou les mouvements de l'animal. Ces paramètres sont enregistrés en continu sans induire de stress aux animaux.

Dans le cadre des produits biologiques (ICH S6) ou anticancéreux (ICH S9), les études de pharmacologie de sécurité peuvent être intégrées dans les études de toxicologie réglementaire (ICH M3). Les animaux impliqués dans ces études sont généralement équipés de gilets intégrant des outils de télémétrie externe permettant de transmettre à distance (sans fil) les signaux d'électrocardiogramme, de respiration, de température et dans certains cas de pression artérielle par le biais d'un émetteur miniature implanté. Ces paramètres sont enregistrés en continu sans induire de stress aux animaux.

Dans les études de la pharmacologie de sécurité, les fonctions cardiovasculaire, respiratoire et système nerveux central sont évaluées après une ou plusieurs administrations d'un candidat médicament chez le chien ou le mini-porc. En général, le candidat médicament sera administré une seule fois dans les études de pharmacologie de sécurité autonomes ou quotidiennement dans les études de pharmacologie de sécurité intégrées à la toxicologie réglementaire.

L'espèce animale impliquée pour les études de pharmacologie de sécurité est celle utilisée dans les études de toxicologie réglementaire. Ce choix est basé sur plusieurs critères notamment l'aspect métabolique et le profil pharmacocinétique, la réponse pharmacodynamique et la sensibilité du modèle par rapport aux fonctions physiologiques évaluées.

La voie d'administration est le plus souvent celle choisie pour l'administration chez l'homme. Pour les études de pharmacologie de sécurité intégrées à la toxicologie, les doses administrées sont celles de la toxicologie réglementaire. Pour les études de pharmacologie de sécurité autonome, les doses administrées sont le plus souvent des doses sélectionnées pour n'induire aucun effet toxique important pouvant masquer des propriétés pharmacologiques de la molécule testée.

Il n'existe à ce jour, aucune méthode alternative (*in vitro*) aux études de pharmacologie de sécurité couvrant l'évaluation des fonctions vitales de l'organisme *in vivo* et avec des interactions multiples entre ces différentes fonctions.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est évalué à 82 chiens et 82 mini-porcs sur 5 ans. Le nombre d'animaux est défini à minima afin d'obtenir des résultats robustes en limitant tout biais lié à une variabilité interindividuelle et ainsi d'atteindre les objectifs de l'étude sur un nombre optimisé d'animaux. A l'exception des animaux utilisés dans le cadre de pharmacologie de sécurité intégrée à la toxicologie, tous les animaux de télémétrie utilisés en pharmacologie de sécurité sont réutilisés.

En fonction de la technique de télémétrie utilisée, les animaux sont hébergés pendant l'enregistrement soit en groupe soit individuellement avec un contact visuel entre eux.

Dans le cadre d'études de pharmacologie de sécurité autonomes impliquant entre autres les nouvelles entités chimiques, un design en 'cross-over' est le plus souvent utilisé pour limiter le nombre d'animaux utilisés. Dans ces conditions tous les animaux sont traités à toutes les doses dans un ordre aléatoire avec une période de récupération entre chaque administration de la substance.

Les paramètres sensibles enregistrés dans le cadre des études de pharmacologie de sécurité (entre autres, pression artérielle et fréquence cardiaque), exigent une attention très particulière aux conditions de santé des animaux. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

Pour réduire au minimum tout comportement induit par le stress, et afin de stimuler l'activité physique des animaux et de développer leurs capacités d'adaptation, un programme d'enrichissement (renforcement positif, jouets, musique) est systématiquement appliqué à la fois pour le chien et le mini-porc.

6978. L'utilisation de drogues illicites et la dépendance à ces drogues constituent un véritable problème de société et de santé publique à travers le monde. Afin d'endiguer cette augmentation, des thérapeutiques de substitution à l'héroïne ont été introduites dans l'arsenal thérapeutique depuis près de 15 ans. Celles-ci font appel à des produits morphinomimétiques de synthèse faiblement euphorisants qui ont contribué à la réduction significative du trafic d'héroïne et des intoxications par surdosages. Cependant, leur usage a été rapidement associé à la survenue de morts asphyxiques chez l'utilisateur occasionnel comme chez le toxicomane que ce soit dans un cadre de polyconsommation (à l'éthanol et aux benzodiazépines notamment) ou lors d'un mésusage (injection intraveineuse). C'est pourquoi, à la vue des données cliniques ainsi que de précédents travaux publiés sur le sujet, l'exploration des effets respiratoires des produits de substitution et de ses associations paraît par conséquent primordiale pour améliorer la connaissance et la compréhension des mécanismes délétères, afin de pouvoir proposer à terme une meilleure prise en charge des patients intoxiqués. Pour cela, nous envisageons de mener à bien les objectifs suivants : 1- Etudier de façon comparative la toxicité cardio-respiratoire des produits de substitution et sa variabilité de réponse lorsqu'il est utilisé seul ou en association ; 2- Préciser les mécanismes exacts de cette toxicité ; 3- Mettre au point un traitement antidotique optimal en cas d'intoxication par surdosage.

Pour ce faire, ce projet nécessitera 870 rats qui seront utilisés au travers de 6 procédures différentes réalisées chez le rat mâles Sprague-Dawley après administration des différentes molécules selon le schéma expérimental suivant :

- Etude de la pharmacocinétique plasmatique et cérébrale des différentes molécules étudiées
- Etude des effets respiratoires périphériques (prélèvements sanguins et gaz du sang) et métaboliques
- Etude télémétrique des effets respiratoires centraux et périphériques (pléthysmographie et électromyogramme, EMG)
- Etude télémétrique des effets cardiaques (électrocardiogramme, ECG)
- Etude de l'implication des différents systèmes monoaminergiques dans la dépression respiratoire centrale avec mesure des concentrations en monoamines cérébrales.

Ce projet a été élaboré afin de respecter les 3R en réduisant au minimum le nombre d'animaux utilisés et en limitant au mieux le mal-être possible des animaux pendant l'expérimentation. En effet, l'ensemble des procédures ne sont pas remplaçables par des expériences *in silico* ou *in vitro*, en raison d'une approche physiopathologique intégrée sur animal entier (système respiratoire, et cardiovasculaire). De plus, à la suite d'une veille bibliographique, seules les études ne reproduisant pas des études déjà publiées (afin d'éviter tout doublon et une utilisation excessive d'animaux) sont envisagées et le nombre d'animaux utilisés par groupe sera réduit au minimum grâce à des tests statistiques (afin d'avoir des résultats interprétables avec un nombre minimum d'animaux utilisés). De plus, dans ce souci de réduction du nombre d'animaux, le bien-être des animaux sera vérifié quotidiennement par un personnel qualifié et une prise en charge optimale sera effectuée en cas de mal-être, dans la limite du possible pour ne pas interférer avec l'expérience en cours. Enfin, ce projet sera mené chez le rat afin d'être cohérent avec la bibliographie déjà présente sur le sujet et les différents travaux déjà publiés par notre équipe qui utilisaient aussi préférentiellement le rat Sprague-Dawley.

Cette étude nous permettra ainsi chez l'Homme une meilleure prise en charge des intoxications par les opioïdes forts en cas d'intoxication.

6979. La canulation cérébrale des animaux expérimentaux permet au scientifique d'étudier de façon sûre et répétable des zones cérébrales d'intérêt. Cette approche est indispensable à la compréhension de mécanismes physiologiques sous contrôle central comme la reproduction, le comportement, la motricité, la douleur, etc... La chirurgie cérébrale des grands mammifères et notamment des ovins était jusqu'alors guidée par l'utilisation de rayons X : des appareils radiographiques permettaient, suite à la prise de deux clichés latéral et dorsal, une reconstitution 3D du cerveau et l'approche relativement précise des zones cérébrales variées. L'imagerie radiographique a considérablement évolué et le scanner a aujourd'hui des potentialités bien supérieures : détermination des zones cérébrales même sans injection de produit de contraste, reconstruction 3D automatique en une prise de vues, navigation intracérébrale. L'imagerie par résonance magnétique permet d'encore mieux cibler les structures d'intérêt mais avec un temps d'acquisition plus long. Notre objectif est d'utiliser cet outil pour optimiser nos approches cérébrales en les rendant moins invasives et encore plus précises. Pour ce faire, il nous faut mettre au point un cadre pour ovins non métallique qui permette l'acquisition de ces images. Nous testerons dans un premier temps la fixation correcte de la tête sur des ovins anesthésiés qui pourront ensuite retourner dans leur élevage. Une fois l'immobilité de la tête confirmée, nous développerons l'approche de diverses zones cérébrales. Ces mises au point seront faites sur 30 brebis (nombre maximal) qui seront soit réintégrées dans leur élevage d'origine soit proposées aux chercheurs selon leur thématique de travail. La règle des 3R a été respectée comme suit dans ce projet :

Remplacement : la mise au point technique de cette approche passe obligatoirement par des essais *in vivo*.

Raffinement : Les animaux seront anesthésiés dans les règles de l'art et des analgésiques seront systématiquement administrés de l'induction de l'anesthésie à la phase post opératoire. Toute situation anxieuse sera évitée, les animaux seront laissés en groupes sociaux, sur paille de qualité, avec du foin ad libitum.

Réduction : Si la mise au point s'avérait rapide, nous n'utiliserions pas la totalité des animaux. Nous proposerons ensuite nos résultats expérimentaux à la communauté scientifique afin de généraliser cette approche chirurgicale que nous envisageons moins invasive.

6980. L'inflammation est une réaction de défense immunitaire stéréotypée du corps à une agression : infection, brûlure, allergie... L'inflammation chronique est désormais reconnue comme une réponse à de nombreuses transformations de l'environnement et du comportement modernes (sédentarité, malbouffe, pollution, altérations du microbiote humain...) et un facteur important dans le développement de maladies de civilisation telles que la résistance à l'insuline, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, les maladies immunitaires, et même les troubles de l'humeur et du comportement.

L'inflammation se manifeste par différentes phases successives au niveau des vaisseaux avec leur dilatation et une augmentation de leur perméabilité, et des cellules de l'organisme, notamment des globules blancs. Cela permet d'augmenter la circulation du sang afin d'éliminer les cellules mortes et les toxines responsables de cette inflammation, et d'apporter les éléments nécessaires à la guérison, notamment des globules blancs (lymphocytes) pour combattre les corps étrangers.

L'inflammation générale peut être mimée chez le rat par injection intrapéritonéale d'une suspension de parois bactériennes (bactéries *Escherichia coli*) appelées lipopolysaccharides ou LPS. Suite à cette injection, on observe tout d'abord une diminution de la température corporelle des animaux liée à un afflux de sang au niveau abdominal, puis une augmentation de cette température corporelle liée à la sécrétion de composés responsables de l'inflammation, notamment des cytokines.

Le suivi de la température corporelle des animaux peut se faire par des mesures répétées au niveau rectal à l'aide d'un thermomètre, induisant un stress chez l'animal à chaque prise de température, ou par implantation dans l'organisme d'un dispositif permettant une mesure en continue sans manipulation des animaux, technique appelée télémetrie. Différents dispositifs sont déjà disponibles, nécessitant une opération chirurgicale pour les insérer dans l'organisme des animaux.

Le but de notre projet est de valider un nouveau dispositif de mesure de la température corporelle chez le rat au cours de l'induction d'une inflammation générale par injection de LPS. Le dispositif, capteur stérile en forme de gélule de 1,77 cm de long, 0,89 cm de diamètre et d'un poids de 1,7 g, est mis en place après activation dans la cavité abdominale des rats placés sous anesthésie gazeuse, librement sans nécessité de l'accrocher aux tissus ou organes. Une semaine après implantation de ce dispositif, l'inflammation générale est induite par une injection unique de LPS dans l'abdomen (voie intrapéritonéale ou IP) et le suivi de la température corporelle est effectué pendant 24 heures.

Pour ce projet, 32 rats mâles Wistar de 300 g issus d'une étude préalable (ayant subi une procédure de classe modérée et après une période de récupération de 2 semaines) seront utilisés. Ils seront divisés en 4 groupes de 8 rats chacun comme suit :

- Groupe 1 : opération chirurgicale pour implantation capteur et injection IP de véhicule
- Groupe 2 : opération chirurgicale implantation capteur et injection IP de LPS
- Groupe 3 : opération chirurgicale à blanc, injection IP de véhicule et prise de température rectale
- Groupe 4 : opération chirurgicale à blanc, injection IP de LPS et prise de température rectale

L'opération chirurgicale à blanc consiste à ouvrir puis refermer l'abdomen des animaux sous anesthésie, sans implantation de capteur. Nous comparerons ainsi les températures corporelles des animaux obtenues avec ces deux méthodes de mesure.

Les animaux seront observés régulièrement et quotidiennement après l'opération chirurgicale, avec un suivi de poids corporel jusqu'à la fin de l'expérimentation, et toutes les ½ heures pendant 10 heures après induction de l'inflammation générale en même temps que la prise de température corporelle. En cas de détresse des animaux au cours de l'expérimentation, difficultés respiratoires, convulsions, vocalises..., ceux-ci seront euthanasiés dans des conditions éthiques par injection intrapéritonéale d'une surdose de pentobarbital. L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anti-inflammatoires de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests *in vitro* ou *in silico*) (remplacement). Les essais permettront de déterminer la sensibilité du nouveau dispositif de télémetrie, ce qui permettra à l'avenir d'utiliser cette technique moins stressante pour les animaux. Cela permettra également d'utiliser moins d'animaux (réduction) et dans des conditions moins stressantes pour l'animal (raffinement).

6981. De nombreuses pathologies survenant au cours du développement (amblyopie, cataracte congénitale) ou suite à un accident (anopsie, négligence), peuvent conduire à une atteinte de la représentation visuelle, très handicapante dans la vie quotidienne. Cependant, notre cerveau n'est pas figé et s'adapte tout au long de la vie aux informations qu'il reçoit. Cette capacité d'adaptation exceptionnelle appelée plasticité nous permet par exemple d'apprendre à lire quand on est enfant, ou de s'initier à l'informatique même à un âge avancé. Le cerveau même adulte reste dynamique et ses réseaux de neurones se réarrangent en permanence. Sachant cela, nous nous sommes demandé s'il était possible d'utiliser cette propriété du cerveau pour que les réseaux fonctionnant mal puissent redevenir opérationnels. Ceci permettrait, entre autres, à des adultes souffrant de handicap visuel de pouvoir réapprendre à voir correctement, tout en personnalisant pour chaque patient le traitement en fonction du type spécifique de pathologie.

Dans cette optique, nous enregistrerons l'activité cérébrale de 4 macaques (*Macaca mulatta*) avec des techniques d'imagerie médicale (IRMf) et des électrodes posées à la surface du cerveau (EcoG). Ces enregistrements seront effectués avant et après des stimulations permettant d'induire une plasticité dans la partie du cerveau dédiée à la vision. Nous faisons l'hypothèse que nos différentes stimulations induiront des changements dans l'organisation d'aires spécifiques du cerveau, nous permettant par la suite de personnaliser les traitements de réhabilitation du déficit visuel pour chaque patient.

Le projet combinant analyse du comportement et injections pharmacologiques intracérébrales, il sera réalisé chez le primate non humain, le seul modèle animal doté d'un système visuel comparable à celui de l'Homme et capable d'effectuer des tâches aussi complexes que celle réalisées par l'Homme. Nos travaux ne peuvent pas être réalisés grâce à des techniques alternatives comme les cellules en culture ou la simulation informatique car à l'heure actuelle, elles ne permettent pas d'atteindre le niveau de complexité requis pour l'étude de la plasticité cérébrale.

Nous utiliserons deux animaux au minimum et quatre au maximum, en fonction de leur capacité à apprendre les tâches que nous leur proposerons. Le nombre d'animaux est réduit à la valeur minimale permettant d'obtenir des résultats robustes et reproductibles. De plus, chaque animal est testé pour l'ensemble des conditions de l'expérience de façon répétée et sert comme son propre contrôle.

Enfin, nous sommes particulièrement attentifs au bien-être de nos animaux et veillons à ce que leurs apprentissages se fassent de manière positive en les récompensant avec des friandises et des jouets. De plus, la technique d'IRM que nous utilisons permet d'obtenir un grand nombre de données sans être invasive pour l'animal.

6982. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) et le lymphome sont deux maladies du sang. La LLC est la leucémie la plus commune dans le monde occidental, elle affecte principalement des patients âgés et elle est encore incurable sans la transplantation allogénique de cellules souches.

Les lymphomes représentent, quant à eux, le 6ème rang par ordre fréquence des cancers survenant chez les hommes et les femmes ainsi que le 7ème en termes de cause de décès par cancer en France. On diagnostique en France 11000 nouveaux cas chaque année et près d'un patient sur deux atteint d'un lymphome décède de sa maladie.

Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants (CPP) sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée à la fois comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques mais également comme molécule thérapeutique de par leurs propriétés anti-tumorales. L'utilisation de ces CPP est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés.

Parmi ceux-ci, un CPP a été évalué *in vitro* sur des cellules tumorales de LLC et de lymphomes ainsi qu'*in vivo* chez la souris. Les résultats *in vivo* obtenus ont montré des bénéfices thérapeutiques dans les deux maladies. L'objectif de ce projet d'étudier l'activité thérapeutique de ce CPP. Les modèles animaux utilisés seront soit des modèles de LLC ou de lymphomes humains xénotransplantés chez la souris SCID et la souris nude. Le nombre d'animaux utilisés sera de 96 souris réparties en 60 souris SCID et 36 souris BALB/c nude ; afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider l'activité thérapeutique du CPP.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, les molécules ont été évaluées *in vitro* dans un premier temps sur cellules fraîches de patients atteints de LLC et sur lignées cellulaires immortalisées (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'anxiété des animaux (principe de raffinement).

6983. La détermination de la toxicité aiguë d'un futur médicament est une étape impérative dans son développement et de sa commercialisation. En effet il s'agit d'une information réglementaire indispensable dans le dossier adressé aux autorités avant la première administration à l'Homme. Cette information est également utilisée pour la demande d'autorisation de mise sur le marché. Cette étude de toxicité aiguë permet de déterminer la dose toxique d'une substance et donc en connaissant la dose efficace sur une pathologie d'évaluer le rapport bénéfice/risque pour le patient.

Dans notre projet nous souhaitons déterminer la toxicité aiguë de médicaments selon les recommandations de l'OCDE. Il s'agit d'administrer une première dose de produit à une petite cohorte de ratte puis d'ajuster les doses suivantes en fonction des résultats recueillis sur cette première cohorte. Les effets observés dans un groupe déterminent la suite de qui peut être :

- L'arrêt de l'essai
- L'administration de la même dose à 3 animaux supplémentaires
- L'administration de la dose immédiatement inférieure ou supérieure à 3 animaux supplémentaires

Le choix de la dose initiale est fixée lors d'une réunion préparatoire à laquelle sont présent le responsable du projet et au moins un membre de la structure chargée du bien-être animal. Toutes les informations disponibles sur la substance d'essai telles que ses propriétés physicochimiques, les effets biologiques observés dans des essais *in vitro* ou *in vivo* sont utilisées pour le choix de la dose initiale.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus, le respect des recommandations de l'OCDE dans cette démarche permet d'obtenir des résultats qui seront reconnus dans un grand nombre de pays et ainsi de permettre la réduction du nombre d'animaux utilisés.

Selon les recommandations le premier groupe expérimental comprend 3 animaux, puis en fonction des résultats les groupes suivants sont choisis selon l'arbre de décision proposé dans la recommandation 423 de l'OCDE. Chaque détermination de la toxicité aiguë implique au maximum 24 animaux. Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 720 rats est envisagée.

6984. Notre projet de recherche consiste à utiliser des souris pour produire des anticorps monoclonaux contre des cibles retrouvées dans les maladies cardiovasculaires et la maladie d'Alzheimer. Les souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet sont au nombre de 75.

REMPLETER : Les anticorps sont des outils pour détecter ou traiter les pathologies. La majorité des anticorps est obtenue chez l'animal malgré des tentatives pour les produire avec des cellules. Cependant ces derniers sont de mauvaise qualité, coûteux et parfois ne sont pas aboutis. Nombreuses sociétés et partenaires académiques font appel à nous pour développer des anticorps monoclonaux à des fins de diagnostic ou thérapeutique.

REDUIRE : Des tests statistiques sont utilisés afin d'obtenir le nombre d'animaux nécessaires par groupe expérimental et d'obtenir ainsi des résultats exploitables.

RAFFINER : Les prélèvements de sang sont réalisés dans la région maxillo-faciale contrairement aux prélèvements de sang au niveau du sinus retro-orbital plus contraignant pour l'animal. Une désinfection locale de la peau est réalisée avant chaque injection. Les animaux sont observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et euthanasiés en cas de perte significative de poids et d'infection locale cutanée.

6985. Ce projet porte sur le développement et l'optimisation de plasmides et de vecteurs lipidiques innovants dans le cadre de stratégies de thérapies géniques appliquées au traitement de myopathies telle que la myopathie de Duchenne. Nous voulons ici évaluer l'efficacité de transfert de gènes *in vivo* de formulations, issues de nos recherches, et préalablement testées de façon approfondie en conditions *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner 20 formulations représentant les candidates les plus intéressantes à tester à l'heure actuelle en termes de niveau et durée d'expression du gène transféré, au niveau de cellules musculaires. Au cours de ce projet 110 souris Swiss seront utilisées. L'imagerie de bioluminescence permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaires, en bon accord avec la règle des 3R. Afin de réduire stress et douleur chez les animaux, l'administration des complexes (plasmides-vecteurs) par méthode hydrodynamique sera faite sous anesthésie et sera suivie d'une analgésie durant 72 heures. De plus, toutes les séances d'imagerie sont réalisées sous anesthésie gazeuse.

6986. Le corps humain est constitué de milliards de cellules. Dans les tissus sains il est nécessaire de constamment remplacer les cellules qui sont endommagées ou mortes, afin d'assurer le bon fonctionnement de nos organes. C'est le rôle des cellules souches qui se divisent régulièrement afin de régénérer notre stock cellules fonctionnelles. La division de nos cellules est très finement contrôlée par l'organisme mais il arrive que, suite à l'acquisition de mutations génétique à cause de facteurs environnementaux (mauvaise alimentation, pollution, U.V., vieillissement, etc.), la division de certaines cellules ne soit plus contrôlée. Cela donne provoque l'apparition d'un ensemble de cellules en division : la tumeur.

Etant donné que les cellules tumorales se divisent sans cesse, celles-ci ont besoin de beaucoup d'oxygène et de nutriments pour pouvoir se développer. Or, il est connu que les cellules tumorales sont capables de produire massivement des molécules qui augmentent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur afin que ceux-ci subviennent à leur besoins croissants. Ce processus biologique est appelé l'angiogenèse tumorale.

Les chercheurs et les industries pharmaceutiques ont alors développé des traitements visant à cibler la formation des vaisseaux sanguins tumoraux afin d'asphyxier les tumeurs. Ces traitements ont donné des résultats intéressants chez les patients et permettent de réduire le volume tumoral mais ne suffisent pas à soigner complètement la maladie. En effet, il a été observé que les cellules tumorales privées d'oxygène et de nutriments avaient tendance à devenir plus agressive et à chercher un site plus propice à leur développement que la tumeur initiale. Or, cette dissémination des cellules dans l'organisme, également appelé dissémination métastatique est la cause majeure de mortalité suite à un cancer. De plus, réduire le nombre de vaisseaux sanguins dans la tumeur empêche une circulation sanguine correcte dans la tumeur et empêche la chimiothérapie d'y accéder et donc celle-ci tue moins de cellules tumorales.

Le laboratoire travaille sur les facteurs moléculaires capables de bloquer la formation de vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Nous nous intéressons particulièrement à un de ces facteurs, présent en grande quantité dans les cancers du sein. Notre stratégie thérapeutique est de bloquer l'action anti-angiogénique dans une tumeur mammaires afin d'augmenter la formation de vaisseaux sanguins sains. Cela permettrait :



-d'éviter que les cellules tumorales manquent d'oxygène et de nutriments et donc d'éviter qu'elles aillent créer des métastases bien plus dangereuses pour la survie du patient que la tumeur initiale.

-d'augmenter la pénétration de la chimiothérapie dans la tumeur et donc de mieux traiter le patient.

Pour réaliser ces expériences nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés en effectuant le plus de validation possible dans des modèles cellulaires *in vitro*. Nos expériences ont pour finalité l'amélioration de la santé humaine et l'expérimentation *in vivo* est non substituable à aucune autre méthode car nous avons besoin d'un organisme complet pour étudier les vaisseaux sanguins tumoraux. Nous avons réduit au maximum le nombre de souris par groupe en prenant en compte les précédentes expériences que nous avons effectué afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs dès la première expérience (240 animaux au total). Un maximum de données sera récolté de chaque animal : perfusion tumorale, dissémination métastatique dans les poumons, réaction immunitaires (nœuds lymphatiques etc.), facteurs circulants (plasma), etc. Enfin, le bien-être animal sera évidemment pris en compte car les expériences de tumorigénèse peuvent être douloureuses pour l'animal si elles ne sont pas contrôlées. Ainsi les animaux seront anesthésiés durant l'étape d'implantation tumorale et à l'euthanasie avec une analgésie post injection et en cas d'apparition des premiers signes de souffrance/douleur. Les souris seront euthanasiées dès l'apparition de signes de douleurs dues à la tumeur ou à ses métastases et une taille limite tumorale sera fixée (end point). Le groupe social sera également favorisé avec au moins 5 animaux par cages.

6987. Les maladies inflammatoires chroniques (comme les maladies autoimmunes et allergiques) représentent un problème majeur de santé publique et les approches thérapeutiques utilisées aujourd'hui ne donnent pas entière satisfaction. Il est donc important de comprendre la physiopathologie de ces maladies au niveau cellulaire et moléculaire afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ceci est basé sur l'utilisation des modèles animaux (lignées pures génétiquement homogènes, environnement "contrôlé") qui reproduisent en majeure partie les caractéristiques cliniques et histopathologiques des maladies humaines. De plus, il est tout à fait possible d'appliquer les résultats obtenus dans les modèles animaux à la pathologie humaine. Nos travaux antérieurs ont permis de mettre en évidence 2 molécules (Foxo3 et Eomes) jouant un rôle majeur dans l'activation et la différenciation des lymphocytes T. Cependant, la contribution de ces molécules dans les maladies inflammatoires chroniques reste inconnue. L'objectif de notre projet de recherche vise à étudier l'implication de ces protéines dans ces maladies en utilisant des modèles animaux de sclérose en plaques, de maladie inflammatoire de l'intestin (IBD) et d'allergie chez la souris. Le choix de ces modèles est basé sur le fait que ces désordres immunologiques impliquent des effecteurs immunologiques différents. En effet, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, modèle animale de sclérose en plaques, est médiée par les lymphocytes Th1/Th17 ; le modèle d'IBD permet l'étude spécifique des LT régulateurs par rapport au LT effecteurs alors que le modèle de maladie allergique induite par sensibilisation à l'ovalbumine implique les lymphocytes Th2. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées (Knock-Out ou Knock-Out conditionnelle) pour les molécules d'intérêt Foxo3 et Eomes.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 2110 animaux sur 5 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 immunitaires. 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. Ce projet a déjà obtenu l'accord du comité d'éthique en expérimentation animale et 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 5 à 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. De plus, les personnes responsables du projet ont été formées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques ; elles garantissent de la formation et de l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées.

6988. Les stress oxydants et l'inflammation locale sont des facteurs reconnus favorisant les deux plus grandes dégénérescences rétiniennes : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et les rétinites pigmentaires (RP). La rétine présente une « para inflammation », composante des maladies liées à l'âge, qui s'aggrave lors de l'apparition de la pathologie. Alors que des solutions thérapeutiques existent contre la DMLA forme humide, notamment avec l'utilisation d'agents anti-VEGF, il n'existe aucun traitement contre la DMLA sèche. Cette dernière forme de la DMLA résulte d'une atrophie progressive des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, de la choroïde et des photorécepteurs. Les patients atteints de RP, quant à eux, présentent une dégénérescence progressive des photorécepteurs qui conduit à une perte totale de la vision.

Le facteur H du complément, CFH, un régulateur de la voie alterne a été identifié comme impliqué dans la pathogénie de la DMLA depuis la description d'un polymorphisme en position Y402H qui augmente le risque de DMLA de 6 fois. Au vu de l'importance centrale du CFH dans le contrôle du versant inflammatoire des dégénérescences rétiniennes, ce projet a pour objectif d'évaluer les effets neuro-protecteurs de différents variants du CFH dans la rétine présentant des pathologies de type DMLA (dégénérescence liée

à l'âge) ou RP (rétinite pigmentaire). Notre objectif est donc de développer une étude afin de déterminer si le CFH pourrait être une molécule potentiellement utilisable en thérapie anti-dégénérative dans la rétine. Ce projet soumis fait suite à l'étude « évaluation du CFH dans le traitement de la dégénérescence rétinienne » dans le modèle murin de dégénérescence rétinienne rd10. Les premiers résultats ont montré que le CFH ralentit la dégénérescence en diminuant le stress oxydant. La suite de cette étude vise à évaluer deux voies d'administration : l'injection intra-vitréennes (IVT) de différents variants recombinants du CFH et l'électrotransfert (ET) dans le muscle ciliaire de plasmides codants pour les protéines d'intérêt, chez le rat P23H, un autre modèle de dégénérescence rétinienne et la souris RD10 (modèle de RP différent des rats P23H).

Les conditions de manipulation des animaux décrites ont été définies pour respecter les protocoles validés et pour minimiser la douleur. L'utilisation de tests statistiques non paramétriques permettra de réduire le nombre d'animaux par groupe (4 à 6). Au total 140 animaux seront utilisés pour ce projet. Ces animaux sont élevés à l'animalerie dans un milieu enrichi de nids végétaux et de "jouets" type petite maison. Des expériences *in vitro* sur la toxicité du CFH et de ces fragments seront réalisées sur des lignées cellulaires de rétine (type Arpe19 : cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine) ce qui a conduit à réduire le nombre d'animaux et à remplacer certaines expérimentations *in vivo* par des expériences *in vitro* dans ce projet. Suite aux procédures mise en place les animaux seront surveillés à leur réveil (comportement, angoisse, douleur).

6989. Le diabète sucré de type 2 est un problème de santé publique majeur. Il touche actuellement environ 3 millions de personnes en France et environ 387 millions dans le monde. Sa prévalence ne cesse d'augmenter. Le diabète se caractérise principalement par une hyperglycémie qui est à l'origine de nombreuses complications. Elles affectent le cœur les vaisseaux, l'œil, le rein et les nerfs. Le tissu osseux n'est pas épargné. Chez les patients atteints de diabète de type 2, l'os est fragile et le risque de fracture est élevé. Des études récentes ont montré que l'hyperglycémie chronique exerce des effets délétères sur les cellules qui forment l'os et celles qui le résorbent. Néanmoins, leurs effets sur les ostéocytes qui constituent le chef d'orchestre du remodelage osseux, ainsi que sur les propriétés de la matrice osseuse ne sont pas complètement compris.

L'objectif de ce projet est d'explorer les effets du diabète à la fois sur les propriétés structurales, mécaniques et biologiques de l'os chez des rats Zucker diabetic fatty (ZDF : génétiquement modifiée, doublement récessif pour le récepteur à la leptine). Ce modèle animal mime fidèlement le diabète de type 2 chez les humains, depuis son mode d'installation jusqu'aux complications chroniques associées à cette maladie. L'analyse du tissu osseux (fémur et tibia) sera effectuée après l'euthanasie des animaux. L'étude impliquera des rats à 3 stades de maladie différents : pré-diabète (rats âgés de 7 semaines, groupe 1), diabète à court terme (rats âgés 13 semaines, groupe 2) et à long terme (rat âgés de 23 semaines, groupe 3). La progression des effets délétères du diabète sur l'os sera contrôlée par l'utilisation de rats non diabétiques contrôles (rats LEAN de même sexe et âge). L'évolution de la composition corporelle (masses maigre et grasse) sera évaluée en microscanner *in vivo* et celui des biomarqueurs lipidiques et du métabolisme osseux avec un bilan sanguin. Des acquisitions en microscanner et une prise de sang seront réalisées pour les six groupes de rat sous anesthésie par induction à l'isoflurane. Après l'euthanasie des animaux les échantillons osseux seront récupérés et les propriétés structurales et biomécaniques de l'os seront étudiées. Une prise de sang aux même temps (dosages biochimiques biomarqueurs lipidiques et du métabolisme osseux) sera également effectuée. Pour cette étude, sont nécessaire 72 animaux 36 rats « ZDF » répartis en 3 groupes (n= 12) de 7, 13 et 23 semaines et 36 « LEAN » répartis en 3 groupes (n= 12) de 7, 13 et 23 semaines. Les rats Lean seront hébergés à 4 par cage, les zuckers seront par 3.

Compte tenu que le diabète est une maladie systémique, son étude sur l'intégralité des propriétés de l'os et les biomarqueurs du remodelage osseux ne peut être envisagée *in vitro* d'où la nécessité d'une étude chez l'animal. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous utiliserons un même os pour plusieurs méthodes de caractérisation (biologiques, mécaniques et imagerie multimodale).

La gestion de l'inconfort et de la douleur des animaux sera assurée par des soins appropriés. Les acquisitions en microscanner et la prise de sang seront réalisées sous anesthésie par induction à l'isoflurane.

L'absence de souffrance ou d'inconfort sera contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude grâce à un tableau de score fixant les points limites. En cas de manifestations douloureuses des soins appropriés seront apportés à l'animal. Si aucune amélioration ne peut être constatée, l'animal sera euthanasié. »

Cette étude permettra de mieux comprendre l'impact du diabète sur les propriétés structurales, mécaniques et biochimiques du tissu osseux, par l'obtention d'informations fondamentales méconnues aujourd'hui.

6990. La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est une maladie neurologique progressive et dévastatrice conduisant à une défaillance progressive du système neuromusculaire et à la mort par insuffisance respiratoire. La perte de motricité est la conséquence d'une dégénérescence des motoneurones, les cellules nerveuses qui commandent les muscles volontaires. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. Dans la majorité des cas, la maladie est sporadique, c'est-à-dire qu'elle atteint une personne de manière isolée. Cependant, dans 5 à 10% des cas, la SLA peut toucher plusieurs membres d'une même famille, on parle de SLA « familiale ». Récemment, un nouveau gène responsable de SLA familiales et sporadiques a été identifié, le gène CHCHD10. Des mutations dans ce gène ont également été rapportées dans des formes de SLA/DFT (Démence Fronto Temporale=troubles cognitifs). A ce jour, aucun traitement n'est disponible contre la SLA ou la SLA/DFT. Il est donc primordial de mieux comprendre cette pathologie, et notamment les mécanismes responsables de la mort des motoneurones, dans l'optique à plus long terme de développer des recherches à visée thérapeutique.

Un modèle murin porteur d'une mutation du gène Chchd10 a été produit. Notre projet de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes biologiques, biochimiques et neurologiques aboutissant à la mort des motoneurones. Pour répondre à cet objectif, nous voulons caractériser ce nouveau modèle d'étude de SLA/DFT. Les souris porteuses de notre mutation d'intérêt devraient développer un phénotype de type SLA (ataxie, paralysie progressive des muscles) et/ou associé à une DFT (démence se manifestant

par une anxiété et/ou une agressivité). L'âge d'apparition et le type de symptômes développés seront observés à l'aide de tests de motricité (pesée + tests de suspension par la queue et de mise de la souris sur le flanc pour vérifier la mobilité et donc l'apparition d'une paralysie) et d'une analyse comportementale (apparition d'un comportement stéréotypique et/ou agressif pour les troubles cognitifs). Les animaux porteurs de notre mutation d'intérêt seront comparés à des animaux wild-type (WT). Nous comparerons également les mâles et les femelles transgéniques, ainsi que les mâles transgéniques aux mâles WT et les femelles transgéniques aux femelles WT. Les organes seront récupérés après la mort de l'animal pour des analyses biologiques et biochimiques (marquages immunohistochimiques, dosages biochimiques, analyse de marqueurs apoptotiques et neuronaux...).

La souris Chchd10\_S55L sera le premier modèle murin de DFT-SLA ayant pour origine une mutation au niveau d'un gène mitochondrial. Il permettra de comprendre comment des anomalies mitochondriales sont à l'origine d'un phénotype neurodégénératif. Le gène responsable des anomalies mitochondriales observées dans la SLA est longtemps resté une énigme. L'identification de CHCHD10 a permis de répondre à cette question, mais il est désormais indispensable de comprendre les mécanismes moléculaires liant mitochondries et neurodégénérescence, pour ensuite développer une stratégie thérapeutique.

Dans un but de remplacement, des expériences ont été réalisées précédemment sur des muscles et des fibroblastes de patients porteurs de la même mutation. Ces expériences ont montré que le phénotype clinique de SLA chez l'homme n'était pas limité au système nerveux central et que d'autres tissus, tels que les muscles, étaient affectés. Ces anomalies ne sont pas détectables dans des cellules en culture. Seul un modèle animal permettra d'appréhender tous ces aspects : effets de notre mutation d'intérêt dans différents tissus et à différents âges.

Un maximum de 450 souris Chchd10 sera nécessaire pour ce projet. Dans un but de réduction du nombre d'animaux à utiliser pour cette étude, des statistiques prédictives ont été réalisées dans le but d'utiliser le minimum d'animaux nécessaires.

Dans un but de raffinement, l'utilisation d'une grille d'observation (correspondant au phénotype clinique de SLA/DFT) permettant un suivi optimal des animaux sera mise en place.

6991. Chez l'Homme, des cellules souches mésenchymateuses multipotentes sont présentes dans de nombreux tissus adultes comme la moelle osseuse, le tissu adipeux, les muscles, les vaisseaux... Le tissu adipeux a pour avantage d'être abondant et facilement accessible et représente une source importante de cellules souches mésenchymateuses (ASC : Adipocyte Stem Cells), sans inconvénient majeur pour le donneur (physique et éthique). Ces cellules, après transplantation (thérapie cellulaire), sont susceptibles d'améliorer dans un environnement propice, la régénération de tissus lésés et/ou d'en réduire l'inflammation grâce à de nombreuses propriétés comme la promotion de l'angiogenèse et l'immunomodulation.

Ces cellules sont considérées comme des MTI (Médicaments de Thérapie Innovante) issus de l'ingénierie cellulaire et tissulaire. Au vu de l'intérêt thérapeutique que représentent ces cellules, des études réglementaires permettant d'évaluer, après administration intraveineuse, leur biodistribution et leur toxicité aiguë sont nécessaires afin de pouvoir les utiliser chez l'Homme. Ces études nécessitent l'utilisation d'animaux vivants. Pour réaliser ces études, des cellules souches dérivées du tissu adipeux abdominal humain seront injectées par voie intraveineuse en bolus unique à des souris. 92 souris nude seront utilisées pour ce projet. Ces souris seront hébergées en conformité avec la réglementation. Elles seront acclimatées pendant 5 jours. Des enrichissements tels que maisonnettes ou des morceaux de bois pourront être mis dans les cages pour augmenter leur bien-être. 80 souris seront injectées par voie intraveineuse sous anesthésie générale avec 3 doses d'ASC humaines (20 souris par dose et pour le groupe contrôle et 12 souris comme animaux satellites - pour remplacements éventuels). Avant l'injection des cellules (acclimatation comprise), les animaux seront observés une fois par jour week-end compris. Pendant l'étude, après injection des cellules, les animaux seront observés 2 fois par jour en semaine en 1 fois par jour le week-end et jours fériés. 7 jours après les injections, les animaux seront euthanasiés selon une méthode réglementaire et des prélèvements d'organes et tissus seront réalisés pour des études de quantification de gènes et d'analyses morphologiques et en histologie. La biodistribution des cellules ainsi qu'une dose seuil d'exposition pour les tissus seront déterminées. Une dose permettant une exposition sans effet pathologique sera définie pour la suite des études précliniques réglementaires.

6992. L'ischémie-reperfusion est une séquence inhérente à la transplantation d'organe solide. L'ischémie correspond à la phase où l'organe du donneur est isolé de la circulation sanguine et subit un défaut d'apport en nutriment et en oxygène. La reperfusion de l'organe chez le receveur se traduit par une reprise de la circulation sanguine en lien avec le retour de l'apport en nutriment et de l'oxygène. Globalement, la séquence d'ischémie-reperfusion est connue pour entraîner des lésions sévères de l'organe transplanté, lesquelles sont reconnues pour induire des dysfonctions d'organe/rejets de greffes à court et long-terme. Or des travaux récents en modélisation animale suggèrent la mise en jeu du système immunitaire dans les lésions tissulaires observées au décours immédiat de la séquence d'ischémie-reperfusion. Notre objectif général est : 1) de caractériser les cellules de l'immunité ainsi que les molécules circulantes de l'inflammation qui sont responsables des effets délétères accompagnant la séquence d'ischémie-reperfusion rénale ; 2) d'explorer si des outils neutralisant les molécules circulantes délétères ainsi identifiées peuvent constituer *in fine* les cibles de nouvelles armes thérapeutiques pour réduire les rejets de greffe d'organe solide. Pour mener à bien ce programme de recherche, nous utiliserons un modèle murin d'ischémie-reperfusion par clampage-déclampage du pédicule rénal ainsi que le modèle de lésions aiguës rénales induites par le cisplatine, qui ont déjà été tous les deux documentés dans la littérature pour dépendre du système immunitaire. L'implication de cellules immunitaires particulières ainsi que d'une molécule circulante de l'inflammation sera recherchée *in vivo* en utilisant des souris rendues déficientes par transgénèse spécifiquement pour ces éléments de l'immunité. La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet. Ainsi, afin d'étudier la séquence d'ischémie-reperfusion, les méthodes d'étude *in vitro* sont très limitées en raison de l'absence de vascularisation permanente du rein ou des cellules rénales et de l'impossibilité d'étudier *in vitro* les multiples conséquences de l'ischémie-reperfusion. Il est donc nécessaire d'évaluer la mise en jeu des éléments

immunitaires dans les lésions d'ischémie-reperfusion en utilisant un modèle animal. Le choix porté à la souris repose sur l'utilisation de souris transgéniques irremplaçables et à notre expertise acquise dans la lecture des réponses immunes chez la souris. Pour ce projet de 5 ans, nous utiliserons un total de 864 animaux, minimum requis pour les analyses statistiques, découlant d'un compromis entre les questions de minimisation d'une part et l'accès à l'information scientifique d'autre part, et établi selon les expérimentations antérieures publiées par le laboratoire en modélisation des réponses immunes chez la souris. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et les animaux, hébergés en groupe, bénéficieront d'une analgésie afin de réduire au minimum la douleur liée à la chirurgie.

6993. *Candida (C.) albicans* est une levure commensale de la flore digestive. Ce commensalisme repose sur l'équilibre entre levure, flore et défenses immunitaires de l'hôte. En cas de rupture de cet équilibre, *C. albicans* colonise excessivement la muqueuse digestive et la traverse. Ainsi, les candidémies et candidoses disséminées ont une origine endogène à partir de la flore digestive du patient. L'interaction levure-cellules intestinales muqueuses ou immunitaires reste à préciser. L'objectif du travail est de mieux comprendre la relation *Candida* - cellules épithéliales (barrière intestinale) et l'importance du recrutement local de cellules immunitaires.

Dans un modèle *in vitro* de barrière digestive (co-culture entérocytes/cellules M), *C. albicans* utilise les cellules M comme porte d'entrée à travers la barrière intestinale à l'instar des bactéries pathogènes. Les cellules M ont pour rôle d'incorporer les antigènes situés au niveau de la lumière intestinale pour les transférer aux cellules dendritiques qui les présentent alors aux lymphocytes B. Cette étape constitue une étape clé dans la mise en place de la tolérance immune vis-à-vis de la flore commensale et dans le développement d'une réponse immune lors d'infection. L'importance de ces mécanismes et leur cinétique restent inconnues. Ce projet vise donc à documenter les résultats obtenus dans un modèle *in vitro* d'interaction par une approche de colonisation digestive *in vivo* par l'étude du recrutement de cellules immunitaires au niveau de la muqueuse digestive lors de la mise en place du portage fongique asymptomatique ou lors d'un envahissement de la muqueuse.

Le recrutement de cellules immunes au niveau de relais immuns digestifs et de la rate sera investigué. Quarante-huit souris C57Bl/6 seront utilisées ; cette espèce est utilisée dans de nombreuses études sur l'immunité et il existe des mutants possédant le même fond génétique et pouvant potentiellement être utilisé ultérieurement pour affiner nos résultats. La colonisation digestive ou l'envahissement de la muqueuse seront obtenus par supplémentation de la nourriture avec de la levure ou administration *per os*. Les souris témoins ne recevront pas de levure. Ce modèle d'étude a précédemment été utilisé confirmant l'innocuité des traitements. Après trois, sept et dix jours d'administration fongique, une souris témoin et trois souris colonisées seront euthanasiées selon les procédures préconisées par le Centre de Zootechnie. Les organes seront prélevés (rate, plaques de Peyer, Lamina propria et ganglions mésentériques) pour quantification des cellules d'intérêt par analyse par cytométrie en flux. L'expérience sera répétée deux fois ; ainsi, la compilation des résultats générés permettra une analyse statistique robuste.

Les observations de recrutement cellulaire ne peuvent être conduites que dans un modèle *in vivo*. Cette procédure est considérée de classe légère. Les animaux feront l'objet d'une surveillance quotidienne du bien-être et de l'état clinique des animaux. Tout signe éventuel d'altération (apathie, manque d'appétit, poils hérissés, isolement par rapport aux autres animaux) motivera l'identification de l'animal concerné pour suivi. Sa persistance pendant plus de 24 heures justifie l'euthanasie de l'animal. L'ensemble de ces travaux constitue une démarche originale mettant en parallèle commensalisme-pathogénicité à la fois *in vitro* et *in vivo*.

6994. Depuis quelques années, il apparaît de plus en plus évident que la flore intestinale joue un rôle important dans l'apparition de nombreuses pathologies digestives parmi lesquelles la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, deux maladies intestinales inflammatoires (IBD), mais aussi certains cancers. De plus, certaines bactéries pathogènes sont capables de traverser la barrière intestinale pour provoquer des infections disséminées. Parmi les composants de cette flore, certains *Escherichia coli* sont fréquemment isolés de patients atteints d'IBD et possèdent des gènes de virulence que l'on trouve associés à des souches pathogènes responsables d'infections extra-intestinales graves. Il est important de déterminer le rôle de ces facteurs de virulence dans l'interaction entre les bactéries pathogènes et l'épithélium intestinal pour apporter la preuve de concept de leur implication dans ce type d'infection bactérienne. Dans un souci de remplacement, nos résultats précédents *in vitro* ont mis en évidence les effets de deux facteurs de virulence (CNF1 et HLYA) sur cellules en culture. Ce projet se propose de définir *in vivo* le rôle de CNF1 et HLYA dans le passage d'*E. coli* à travers l'épithélium intestinal. Pour cela, nous étudierons une souche type d'*E. coli* pathogène pour l'homme, et ses dérivées : 1) la souche sauvage exprimant les 2 facteurs de virulence CNF1 et HLYA, 2) la souche mutante exprimant seulement CNF1, 3) la souche mutante exprimant seulement HLYA, ou 4) la souche mutante ne possédant aucun des 2 facteurs de virulence (soit au total 4 souches).

Ces souches seront administrées par voie orale chez des souris préalablement traitées ou non avec un antibiotique, la streptomycine, pour éliminer la flore résidente. Le suivi de cette infection sera effectué après 24h et 48h par mesure de la présence des souches infectantes dans le tube digestif et les selles, ainsi que dans le foie, la rate, les ganglions mésentériques et le sang des animaux. Dans un souci de raffinement et de réduction des animaux requis, une expérience préliminaire sera réalisée, permettant de tester la dose de bactéries maximale qui sera utilisée pour l'infection des souris par voie orale (procédure 1 : 64 souris). Au cas où toutes les doses testées seraient toxiques pour les animaux traités, le projet serait stoppé et étudié à nouveau. L'ensemble du projet (procédures 1 + 2) utilisera un maximum de 544 souris, chaque expérience étant réalisée en triplicat pour des raisons de validité statistique. Cependant au cas où les résultats obtenus après 2 réplicats seraient suffisamment robustes, le projet serait stoppé. Les animaux seront maintenus dans un environnement enrichi, à raison de 5 souris par cage, conformément aux conditions de l'arrêté du 1er février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles NOR : AGRG1238753A. Ils seront surveillés quotidiennement par le personnel animalier, et à chaque intervention (infection et prélèvements) par le personnel en charge de l'expérimentation.

L'expérience préliminaire prévue dans la procédure 1 permettra d'identifier une dose infectante pour la procédure 2 n'induisant a priori pas de douleur chez l'animal pendant le temps court (48h) de l'expérience. Cependant, toute apparition d'éventuels signes graves de douleur sera notée conformément à la grille présentée en annexe et un score de gravité permettra de déterminer le sort des animaux éventuellement affectés.

Ce projet pourrait permettre d'appréhender les facteurs responsables du passage des bactéries au travers de l'épithélium intestinal et donc la mise en évidence de cibles nouvelles pour une meilleure prévention spécifique contre les agents responsables d'infections septicémiques.

6995. Dans le cadre du DUT (diplôme universitaire de technologie) Génie biologique option analyses biologiques et biochimiques (ABB), régi par un programme pédagogique national, nos 28 étudiants sont amenés à "mettre en œuvre les techniques d'expérimentation animale pour mieux comprendre le fonctionnement, la physiologie des systèmes/appareils des organismes animaux". Une introduction à l'expérimentation animale est assurée en S1 (mai/juin), reposant sur un cours magistral de 2h puis un TP de 4h. Dans le cadre du CM, les étudiants sont sensibilisés au respect de l'animal de laboratoire, à la détection de la douleur, de la souffrance, du stress des animaux de laboratoire et à l'importance des protocoles d'anesthésie et analgésie. L'objectif du TP est de faire découvrir l'animal de laboratoire aux étudiants, de leur apprendre différentes techniques de contention, et les différentes voies d'administration et de prélèvements. Ce TP est extrêmement important dans le cursus, car il permet de lever l'appréhension d'un certain nombre d'étudiants qui s'imaginent incapables de travailler sur l'animal de laboratoire, et ainsi d'aborder sereinement les TP de physiologie qui ont lieu en S2 (novembre/décembre). Dans le cadre de ce TP d'introduction, 14 souris seront utilisées (une souris par étudiant), les souris du groupe du matin étant réutilisées pour le groupe de l'après-midi.

En S2, trois TP de physiologie appliquée permettent de prolonger les notions abordées lors des cours magistraux. Nous abordons la régulation *in vivo* de la ventilation, la volémie (et la pression artérielle) et la glycémie. Un total de 42 rats de réforme sera utilisé au cours des TP (1 rat par binôme). Ces TP nécessiteront des étapes de dissection sur animaux anesthésiés, consistant essentiellement à la mise en place d'une canule dans la trachée et de cathéters en jugulaire et carotide. Les rats ne seront pas réveillés en fin de séance, et nous les euthanasierons dès que chaque binôme aura obtenu ses résultats. Par ailleurs, une partie des animaux euthanasiés sera congelée et utilisée pour des TP d'anatomie/dissection.

A travers ces TP, nos étudiants n'approfondissent pas uniquement les notions de physiologie vues en cours, mais ils apprennent comment appréhender un animal, ils se rendent compte réellement des bons et mauvais gestes, des réflexes à avoir, et réalisent l'importance des règles d'éthique qu'on leur enseigne en théorie. En effet, leur formation est complétée par le module "Cultures cellulaires - Méthodes alternatives à l'expérimentation animale" afin de sensibiliser les étudiants à la règle des 3R.

6996. Un nombre croissant de données indique que le comportement des gliomes (prolifération, progression, invasion) et surtout une grande partie de la résistance aux traitements, sont déterminés par une sous-population de cellules tumorales aux propriétés souches et initiatrices de tumeurs. Ces cellules sont dénommées cellules souches de gliomes ou cellules initiatrices de gliomes (GSC ou GIC). Cibler les GSC et leurs propriétés constitue ainsi l'un des principaux défis thérapeutiques. En effet, aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. La demi-vie des patients atteints des formes les plus agressives de gliomes va de quelques mois (enfants) à 2 ans (adultes).

Nous avons identifié des petites molécules capables d'inhiber les propriétés des GSC. Ces molécules sont des produits du métabolisme d'un intérêt thérapeutique évident ; les enzymes qui les produisent sont des cibles de choix pour les manipulations pharmacologiques et certaines des molécules identifiées peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et ont déjà été utilisées en thérapeutique humaine. Notre projet vise à élargir notre étude *in vitro* à l'évaluation *in vivo* du rôle de ces enzymes du métabolisme et de leurs produits dans le contrôle des propriétés souches des GSC mais aussi de cellules souches neurales normales, en caractérisant leurs effets *in vivo* à l'aide de modèles murins aussi proches que possible de la pathologie humaine. En effet, si les modèles *in vitro* permettent d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, seuls les modèles *in vivo* offrent la possibilité d'aborder toute la complexité de la dynamique de l'évolution tumorale telle qu'elle prend place chez les patients. Le meilleur modèle *in vivo* de gliomes de haut grade établi à ce jour est constitué par la greffe dans le cerveau de souris de GSC isolées à partir des résections chirurgicales des tumeurs des patients. Ces greffes aboutissent à des tumeurs qui conservent les anomalies génomiques et les aspects histologiques de la tumeur du patient. La validité de ce modèle est toutefois limitée par l'utilisation imposée de souris immunodéficientes, puisque qu'il s'agit de greffer des cellules humaines dans un tissu murin. Il doit donc être complété par un modèle syngénique dans lequel des GSC de souris sont greffées chez des souris au système immunitaire intact. La combinaison de ces deux modèles et l'utilisation d'un nombre suffisant d'animaux pour évaluer statistiquement les résultats, permet l'obtention de données fiables sur l'implication des voies moléculaires étudiées dans le contrôle du développement des gliomes et sur l'efficacité thérapeutique des molécules testées. Ce schéma expérimental, en renforçant la pertinence translationnelle de la démarche, tient compte de la règle des 3R, notamment l'aspect « raffinement ». Le suivi longitudinal de la croissance tumorale par bioluminescence permet également d'éviter l'euthanasie d'animaux à des temps intermédiaires pour vérifier la cinétique de croissance tumorale et donc de limiter le nombre d'individus. L'inclusion de tests de toxicité systémique sur un nombre réduit de souris préalables à la mise en œuvre des expériences, ainsi que la prise en compte d'un taux de succès expérimental de 80% et du nombre minimal requis pour une analyse statistique s'inscrivent également dans le principe de raffinement.

A l'aide de ces modèles, notre projet vise à évaluer *in vivo* dans des situations au plus proches de la complexité originelle de la tumeur des patients le rôle de différents enzymes du métabolisme et de leurs produits sur l'initiation de la tumeur et sa croissance. Pour y parvenir 30 expériences sont prévues, 5 menées sur 6 souris et 25 menées sur 22 souris réparties en deux groupes (contrôles

et traités), soit un total de 660 souris adultes femelles. Il devrait permettre de tester le rôle de 5 enzymes distincts et d'évaluer les effets de l'administration des métabolites correspondants sur la croissance tumorale.

6997. Le corps humain est constitué de milliards de cellules. Dans les tissus sains il est nécessaire de constamment remplacer les cellules qui sont endommagées ou mortes, afin d'assurer le bon fonctionnement de nos organes. La division de nos cellules est très finement contrôlée par l'organisme mais il arrive que, suite à l'acquisition de mutations génétique à cause de facteurs environnementaux (mauvaise alimentation, pollution, U.V., vieillissement, etc.), la division de certaines cellules ne soit plus contrôlée. Cela donne provoque l'apparition d'un ensemble de cellules en division : la tumeur. Etant donné que les cellules tumorales se divisent sans cesse, celles-ci ont besoin de beaucoup d'oxygène et de nutriments pour pouvoir se développer. Or, il est connu que les cellules tumorales sont capables de produire massivement des molécules qui augmentent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans la tumeur afin que ceux-ci subviennent à leur besoins croissants. Ce processus biologique est appelé l'angiogenèse tumorale. Les chercheurs et les industries pharmaceutiques ont alors développé des traitements visant à cibler la formation des vaisseaux sanguins tumoraux afin d'asphyxier les tumeurs. Ces traitements ont donné des résultats intéressants chez les patients et permettent de réduire le volume tumoral mais ne suffisent pas à soigner complètement la maladie. En effet, il a été observé que les cellules tumorales privées d'oxygène et de nutriments avaient tendance à devenir plus agressive et à chercher un site plus propice à leur développement que la tumeur initiale. Or, cette dissémination des cellules dans l'organisme, également appelé dissémination métastatique est la cause majeure de mortalité suite à un cancer. De plus, réduire le nombre de vaisseaux sanguins dans la tumeur empêche une circulation sanguine correcte dans la tumeur et empêche la chimiothérapie d'y accéder et donc celle-ci tue moins de cellules tumorales. Le laboratoire travaille sur les facteurs moléculaires capables de bloquer la formation de vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Nous nous intéressons particulièrement à un de ces facteurs, présent en grande quantité dans les cancers du sein. Notre stratégie thérapeutique est de bloquer l'action anti-angiogénique dans une tumeur mammaires afin d'augmenter la formation de vaisseaux sanguins sains. Cela permettrait :

- d'éviter que les cellules tumorales manquent d'oxygène et de nutriments et donc d'éviter qu'elles aillent créer des métastases bien plus dangereuses pour la survie du patient que la tumeur initiale.

- d'augmenter la pénétration de la chimiothérapie dans la tumeur et donc de mieux traiter le patient.

Pour réaliser ces expériences nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés en effectuant le plus de validation possible dans des modèles cellulaires *in vitro*. Nos expériences ont pour finalité l'amélioration de la santé humaine et l'expérimentation *in vivo* est non substituable à aucune autre méthode car nous avons besoin d'un organisme complet pour étudier les vaisseaux sanguins tumoraux. Nous avons réduit au maximum le nombre de souris par groupe en prenant en compte les précédentes expériences que nous avons effectué afin d'avoir des résultats statistiquement significatifs dès la première expérience. Un maximum de données sera récolté de chaque animal : perfusion tumorale, dissémination métastatique dans les poumons, réaction immunitaires (nœuds lymphatiques etc.), facteurs circulants (plasma), etc. Enfin, le bien-être animal sera évidemment pris en compte car les expériences de tumorigenèse peuvent être douloureuses pour l'animal si elles ne sont pas contrôlées. Ainsi les animaux seront anesthésiés durant l'étape d'implantation tumorale et à l'euthanasie avec une analgésie post injection. Les souris seront euthanasiées dès l'apparition de signes de douleurs dues à la tumeur ou à ses métastases et une taille limite tumorale sera fixée (end point). Le groupe social sera également favorisé avec au moins 5 animaux par cages. Le nombre d'animaux utilisés dans ce protocole sera au maximum de 240.

6998. L'épidémie de l'obésité dans le monde occidental est accompagnée par une constante augmentation de la prévalence de maladies métaboliques et du diabète de type II. La gravité de ces pathologies est due aux complications touchant différents organes dont le foie et les reins. Le traitement médical de l'obésité fait appel à plusieurs méthodes (restriction calorique, modification du comportement physique, médication). Cependant parmi les facteurs alimentaires, l'hydratation n'est pratiquement jamais tenue en compte. Nos travaux cliniques et expérimentaux suggèrent qu'une hydratation insuffisante favorise le développement de l'insuffisance rénale. De plus, nous avons montré que le développement de la stéatose hépatique (accumulation de gras dans le foie) peut être évité en augmentant l'hydratation dans un modèle génétique d'obésité. Plusieurs études récentes ont montré un lien entre la flore microbienne intestinale et le développement de maladies métaboliques et rénales. Cependant, il n'y a pas d'étude sur l'effet de l'hydratation sur cette flore.

Le but du projet actuel est de tester les effets de l'hydratation sur le développement de l'obésité, de la stéatose hépatique, du dysfonctionnement rénal chez le rat et de déterminer le rôle du microbiote intestinal dans ces effets. Une vieille bibliographique est faite afin de s'assurer que la problématique scientifique posée n'a jamais été explorée auparavant.

L'étude nécessite un modèle *in vivo* avec un suivi à long terme ce que ne permettent pas des modèles *in vitro*. C'est pourquoi, les expériences seront menées sur des rats mâles Wistar. Le nombre d'animaux (54) est limité au maximum. L'ensemble des manipulations animales (hébergement, soins, méthodes utilisées) sera réalisé de façon à limiter au maximum la douleur, souffrance, angoisse de l'animal.

6999. Le carcinome hépatocellulaire reste une maladie avec un mauvais pronostic malgré les progrès récents dans sa physiopathologie et traitement. Bien que la maladie soit biologiquement hétérogène, une dérégulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose sont fréquemment observées et sont susceptibles de contribuer au phénotype malin. Une maladie chronique du foie est associée à une inflammation intra-hépatique, qui favorise la dérégulation de voies de signalisation cellulaire, ce qui déclenche la prolifération et pose ainsi le terrain pour l'expansion des cellules précancéreuses. Le cancer émerge lorsque le contrôle immunologique échoue et les cellules transformées développent une résistance aux voies de signalisation de la mort cellulaire. Les mêmes mécanismes sont impliqués dans la faible réactivité à la chimiothérapie de ce type de cancer. Ces voies moléculaires de

signalisation ont un intérêt thérapeutique, car leur ciblage peut aider à inverser, retarder ou empêcher la tumorigenèse. Dans ce contexte, entre autres, certaines voies de signalisation sont aussi impliquées dans l'autophagie (AP), un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes conduisant à la digestion de leur contenu par les hydrolases lysosomales. L'exécution et la régulation de l'AP mettent en jeu des gènes spécifiques, ATG, et différentes voies de signalisation. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies neurodégénératives et cancers. La restriction calorique est un inducteur majeur de l'AP. Le but de ce projet est d'élucider les mécanismes moléculaires de la régulation de l'autophagie dans l'hépatocarcinogénèse et de trouver ainsi de nouvelles cibles anticancéreuses. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences de croissance tumorale. Cette étude ne peut être conduite *qu'in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de la carcinogénèse hépatiques. Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, prévoit 3 procédures et impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (n=1208), transgéniques (n=3296) et immunodéficientes (n=768). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Néanmoins, nous pourrions avoir à utiliser moins de souris si la significativité apparaît avec moins de souris. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adapté en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, des tunnels en cartons et bâtonnets à ronger). Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent la réalisation des procédures expérimentales dans des conditions optimales.

7000. Il a été démontré que les cellules cancéreuses sont caractérisées par des aberrations du métabolisme cellulaire. Etudier cet aspect des cellules cancéreuses pourrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques anti-tumorales. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de traitements anticancéreux qui ciblent la respiration mitochondriale combinée à des composés capables d'affecter le métabolisme intracellulaire. Cette question ne peut être abordée *qu'in vivo* car il n'existe pas de modèles alternatifs pour étudier l'implication de la respiration mitochondriale sur le contrôle de la croissance tumorale. Pour se faire, nous projetons d'utiliser des souris nude immunodéficientes (maximum n=1080). Ce projet se dessine sur 3 ans et implique des études de croissance tumorale. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement et permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Le nombre d'animaux par groupe sera de 10 et les expériences seront effectuées au maximum 3 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales invalident l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum* ; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

7001. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une technique d'imagerie médicale très largement utilisée, qui permet sans effet secondaire connu de détecter avec une grande précision de nombreuses anomalies, notamment cérébrales. Pour que plus de détails soient visibles au niveau des vaisseaux perfusant une lésion, un produit augmentant le signal dans le sang (agent de contraste) est injecté. Actuellement, il s'agit de molécules à base de gadolinium (Gd), dont la toxicité chez certains patients a été récemment démontrée. L'équipe a conçu une structure (polymère) englobant un grand nombre de molécules de Gd (PGd), qui devrait permettre de réduire les quantités de Gd à injecter et la toxicité potentielle par rapport aux molécules de Gd utilisées actuellement.

Par ailleurs, la structure envisagée permet d'envisager un couplage aisé du Gd à d'autres types de marqueurs (radioactifs ou fluorescents) ou de molécules thérapeutiques pour en faire de nouveaux outils théranostiques. Avant d'évaluer ces nouvelles molécules chez l'Homme, une preuve de concept de l'intérêt de ces PGd doit être faite *in vivo*, en utilisant des animaux sains ou présentant des pathologies proches de celles où ces nouveaux outils apparaissent particulièrement prometteurs.

L'objectif général de ce projet est de démontrer que l'utilisation de ces particules multimodales permettraient : i) de concurrencer les agents de contraste à base de Gd utilisés actuellement (risques toxiques diminués, informations plus précises et spécifiques pour l'identification des tumeurs ou des foyers infectieux) ; ii) d'accéder simplement à des agents théranostiques multimodaux. Ainsi, le projet a pour objectif d'évaluer la biodistribution *in vivo* de ces nanoparticules multimodales biocompatibles.

Dans la première partie du projet, différentes nanoparticules seront administrées à des animaux sains. Les polymères utilisés ont pour caractéristique de se charger de façon non saturable en métaux tels que le gadolinium, le zirconium, le galium, le technétium. Chacun de ces métaux, radioactifs ou non, étant susceptibles de modifier les propriétés pharmacocinétiques de la nanoparticule qu'ils composent, seront évalués indépendamment. Les compositions retenues sont les suivantes : [89Zr]/Zr, [89Zr]/Gd, [89Zr]/Cu, [89Zr]/Ga, [99mTc]/Zr, [99mTc]/Gd, [99mTc]/Cu, [99mTc]/Ga. Le [89Zr] et [99mTc] étant les isotopes détectés respectivement par imagerie microTEP et nanoSPECT. Nous évaluerons leur biodistribution et leur élimination de l'organisme de façon à éliminer les formules susceptibles d'entraîner une toxicité par rétention dans un organe particulier (poumons, foie par exemple).

Le cancer du pancréas est actuellement la quatrième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux. La survie à cinq ans est de 3%. Le seul traitement curatif du cancer pancréatique est la résection chirurgicale, qui n'est malheureusement possible que dans 10 à 15 % des cas, avec un gain minimal de survie de 5% à 5 ans. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ce cancer.

Les nanoparticules objets de ce projet nous paraissent être des outils intéressants à évaluer dans le cadre de la lutte contre ce cancer. C'est pourquoi, après avoir sélectionné la nanoparticule radiomarquée dont les propriétés seront les plus favorables, nous allons évaluer sa capacité de ciblage passif des tumeurs (accumulation par effet « EPR » Enhanced Permeability and Retention, dû à la perméabilité vasculaire augmentée au niveau des tumeurs). Si elle est confirmée, nous pourrions envisager d'utiliser ces nouveaux outils pour le suivi non invasif de la croissance tumorale et la détection de l'apparition de métastases au cours du temps (jusqu'à 8 semaines) par imagerie microTEP ou SPECT.

Seule l'utilisation de ces techniques non-invasives permet de réaliser un suivi longitudinal sur un même lot d'animaux simplement anesthésiés, là où les expériences classiques de biodistribution nécessiteraient l'euthanasie et autopsie d'un lot d'animaux par temps d'observation. Cela permet également de réduire la taille des lots mis en œuvre puisque le fait de pouvoir suivre un même animal au cours du temps permet de s'affranchir du biais induit par la variabilité inter-individuelle. Pour la phase préalable d'étude de biodistribution des nanoparticules par imagerie microTEP et SPECT, nous travaillerons sur des lots de 5 souris. Les 8 types de nanoparticules radiomarquées précédemment cités seront évalués. Soit 5 animaux x 8 conditions = 40 souris. Cette biodistribution pourra être répétée une deuxième fois pour évaluer une deuxième concentration en éléments chimiques non radiomarqués (Zr, Gd, Cu, Ga) soit 80 souris.

La phase d'évaluation de la capacité de ciblage tumoral de la nanoparticule retenue durant la phase 1 (une seule condition) sera réalisée dans deux modèles animaux (animaux sains et modèle tumoral). Le suivi par imagerie sera mené sur 5 animaux par groupe. Pour nous assurer de disposer de 5 animaux ayant développé des tumeurs pancréatiques, 10 souris subiront l'injection intra pancréatique de cellules tumorales. Soit 5 souris saines + 10 souris avec des tumeurs pancréatiques = 15 animaux.

80+15=95 souris.

Afin de respecter la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement adapté à l'espèce sera rajouté aux animaux (igloo, tunnel de carton, « paper wool »). Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours, le suivi étant assuré par le personnel des zootechnies y compris le week-end. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

7002. Le but est de créer une lignée transgénique murine surexprimant de façon ubiquitaire la protéine dCas9-VPR, permettant ainsi l'activation génique par l'intermédiaire d'un ARN guide (gRNA) spécifique du gène étudié.

Nous utiliserons sur 2 ans un total de 185 souris pour la durée du projet. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) remplacement, la création de cette lignée transgénique murine, indispensable à la réalisation de nos études, est une technique de pointe qui est impossible à réaliser *in vitro* ou sur une autre espèce. 2) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de créer notre lignée transgénique ; 3) raffinement, les procédures prennent en compte le bien-être des animaux. Tous les animaux sont hébergés en portoirs ventilés par cage de 5 individus pour les souris et les milieux sont enrichis avec des nids de coton. La température et l'hygrométrie sont contrôlées tout est mis en œuvre pour réduire au minimum la douleur infligée. La lignée sera maintenue sans phénotype dommageable car la protéine dCAS9-VPR n'a pas d'activité biologique en absence d'ARN guide, cela ne fera pas l'objet d'une déclaration dans le projet.

7003. Il a été montré que la diminution des nutriments, connue sous le nom de restriction calorique (CR de l'anglais calorique restriction) a des effets bénéfiques pour la santé et augmente la durée de la vie moyenne. Cette réduction de l'apport en nutriments est une façon physiologique de déclencher l'autophagie, un processus physiologique impliqué dans la réponse aux stress. Les CRMs (Caloric Restriction Mimetics) sont des produits, naturels non toxiques, qui miment les effets biochimiques et fonctionnels de la CR, en stimulant l'autophagie.

Ils existent trois voies biochimiques par lesquelles on peut imiter la CR et qui peuvent être testées chez les rongeurs : (i) la diminution d'AcetylCoA à travers l'inhibition de sa biosynthèse (ex. hydroxycitrate); (ii) l'inhibition des acétyltransférases (e.x. acide anacardique, curcumin, epigallocatechin-3-gallate, garcinol, spermidine); (iii) la stimulation des déacétylases (e.x. nicotinamide, resveratrol). Un des objectifs de ce projet est de déterminer le rôle de ces molécules dans la prophylaxie du cancer du sein. Nous étudierons aussi l'implication du système immunitaire dans l'action des CRMs. Pour cela, l'implication d'animaux vivants est nécessaire. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. L'étude se déroulera sur 5 ans et nécessitera 3852 souris, dont



2568 souris seront utilisées dans une 1<sup>o</sup> phase du projet, et 1284 souris seront utilisés pour la validation des résultats plus significatives si l'hypothèse de travail est confirmée dans la première partie du projet. Ce nombre d'animaux se justifie par la complexité du modèle, les différents âges des souris et les différents contrôles pour montrer l'efficacité de nos modèles. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement ; d'une part, elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). D'autre part, les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Le nombre d'animaux par groupe est de 12 et les expériences seront effectuées au maximum 2 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. De plus, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

7004. Ce projet concerne les traitements de la douleur neuropathique. Celle-ci, due à une lésion ou une pathologie du système nerveux, affecte environ 6% de la population. Certains antidépresseurs, anticonvulsivants et opioïdes représentent actuellement les meilleures thérapies disponibles, mais elles ne sont pas efficaces chez tous les patients et leurs effets secondaires sont nombreux. Le mécanisme conduisant à la douleur neuropathique, ainsi que les mécanismes d'action des traitements actuels ne sont que très partiellement connus, mais les données précliniques déjà existantes ouvrent des pistes pour de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Comment tester le potentiel thérapeutique de molécules sur la douleur neuropathique ? Cet effort préclinique nécessite des modèles reproduisant la condition neurologique ainsi que sa réponse aux traitements existants et un paramètre simple permettant d'identifier facilement l'action thérapeutique et se prêtant à un criblage pharmacologique. De tels modèles ne peuvent être obtenus que grâce à l'animal car la douleur est un processus intégré.

Ce projet vise à tester un grand nombre de molécules pour évaluer leur capacité à soulager la douleur neuropathique. Il nécessitera un maximum de 1305 souris (sur une période de 5 ans) et sera conduit en réduisant chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'en optimisant les procédures.

Les animaux (souris) sont hébergés de 3 à 5 par cage. Chaque cage est enrichie avec des papiers absorbant pour faire un nid, ainsi qu'avec un morceau de bois.

Les animaux étant quasiment consanguins la variabilité phénotypique est considérablement diminuée, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux tout en mettant en évidence un effet statistiquement significatif.

7005. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU), qui affecte 10 % des nouveau-nés en France, est un réel problème de santé publique puisqu'il augmente non seulement la mortalité néonatale mais également le risque de développer, à l'âge adulte, des maladies métaboliques chroniques telles que l'obésité ou le diabète de type 2. Notre équipe a mis en évidence dans un modèle de RCIU chez le rat, que ces animaux présentaient à l'âge adulte des altérations de la barrière épithéliale colique (BEC) associées des modifications métaboliques et épigénétiques. De plus, on observait la présence d'un stress du réticulum endoplasmique (RE), connu pour son implication dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. De façon intéressante, une étude récente réalisée *in vitro* a mis en évidence la présence d'histones désacétylases (HDAC, enzymes de la machinerie épigénétique) au niveau du RE, suggérant une possible régulation du stress du RE par les HDAC. Cependant, on ne sait pas si, à l'inverse, un stress du RE pourrait activer des HDAC et entraîner des régulations épigénétiques de la cellule. L'hypothèse de notre projet est que le stress du RE pourrait contribuer aux modifications métaboliques et épigénétiques de la barrière épithéliale colique (BEC) mises en évidence chez les rats nés avec un RCIU. Pour répondre à cette hypothèse, nous utiliserons un modèle de stress du RE induit chez le rat Sprague-Dawley par une injection intrapéritonéale unique d'un agent stressant du RE, la tunicamycine. Seize rats seront utilisés et euthanasiés 12h après l'injection et les tissus d'intérêts seront prélevés (colon) en vue d'analyses de perméabilité intestinale, d'histologie et de biologie moléculaire.

Ce projet respectera la règle des 3 R:

1. Remplacement : au vu de l'objectif scientifique du projet, il n'existe pas de modèle *in vitro* pertinent de barrière intestinale pour évaluer l'effet du stress du RE, d'où la nécessité d'utiliser des animaux vivants.
2. Réduction : Le nombre de 16 rats a été fixé afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables.
3. Raffinement : Après réception, les animaux sont identifiés et installés par lot de 3 dans des cages. Les animaux sont observés et contrôlés périodiquement, et disposent d'eau et de nourriture à volonté. La stabulation des animaux est effectuée conformément à la réglementation en vigueur relative aux conditions d'hébergement avec enrichissement du milieu.

7006. La trisomie 21 (T21), aussi appelé Syndrome de Down (DS), est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 2000 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles

chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphologies. Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. La finalité de la recherche sur la T21 est donc de parvenir à mettre au point un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades.

Une société pharmaceutique partenaire propose des molécules ayant la propriété d'améliorer les capacités cognitives qui sont altérées dans cette pathologie.

Durant ce projet, nous allons mesurer la toxicité des molécules synthétisées et d'évaluer la dose qui permettrait de restaurer des fonctions intellectuelles aux animaux présentant un déficit. Les molécules seront testées chez la souris, animal pour lequel il existe plusieurs modèles de trisomie 21. Le remplacement de l'animal par des techniques *in vitro* est impossible car l'évaluation des performances intellectuelles et du comportement ne peut se faire que sur un organisme entier.

Ainsi, ces composés seront administrés à des souris contrôles puis à des modèles murins de la trisomie 21, qui feront l'objet de différents tests biologiques afin de mesurer : l'effet du mode d'administration, la distribution des molécules, la métabolisation et la toxicité pour *in fine* leur faire passer des tests de comportement en vue de détecter ou non une amélioration de leur performance intellectuelle.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, un minimum de 60 souris par composé à tester est requis. L'effectif est optimisé afin d'éviter toute duplication expérimentale et respecte ainsi la « réduction » de la règle des 3R. Ainsi, nous devrions utiliser un maximum de 1984 souris environ sur 2 ans.

Les souris bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Au cas où les animaux présenteraient des signes de souffrance, une vétérinaire disponible sur le site interviendra pour s'assurer de leur bonne santé. Ainsi la règle du raffinement est appliquée tout le long du projet.

7007. Notre thématique de recherche est orienté vers l'étude de physiopathologie des maladies neuro-développementales d'origine génétique chez l'homme. Nous avons identifié de nombreux gènes impliqués dans ces maladies parmi lesquels le gène de la tubuline gamma1, TUBG1. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre les rôles de ce gène dans les processus développementaux du système nerveux central et ainsi d'améliorer notre compréhension des mécanismes soutenant l'apparition dans ces maladies chez l'homme. Nous avons déjà identifié des altérations dans les processus de migration, positionnement et différenciation des cellules neuronales au cours du développement, grâce à la technique d'électroporation *in utero*. Cette technique permet le transférer de l'ADN non pathogène par un protocole d'injection *in utero* dans le cerveau d'embryons de souris.

Nos travaux antérieurs ont montré que l'expression des mutations TUBG1 est associée à des anomalies de migration et de positionnement des neurones et que ces anomalies sont stables, y compris en postnatal. Nous souhaitons à présent poursuivre ces travaux et étudier l'effet des mutations dans le gène TUBG1 sur le comportement au stade adulte et notamment sur les capacités d'apprentissage et la susceptibilité aux crises d'épilepsie. Cela permettra de mieux comprendre le lien entre les processus cellulaires au cours du développement et le phénotype des patients chez lesquels les mutations TUBG1 ont été identifiées, à savoir un retard mental souvent accompagné de crises d'épilepsie.

Nous allons faire un transférer d'ADN plasmidique par un protocole d'injection *in utero* dans le système nerveux central d'embryons de souris. Nous allons par la suite laisser naître et grandir ces bébés souris pour les soumettre à des différents protocoles de tests comportementaux à l'âge adulte.

Ce type d'approche s'impose car aucun modèle d'expérimentation *in vitro* ne peut mimer ou refléter toute la complexité des phénomènes ayant lieu dans le cortex en développement ainsi que les altérations éventuelles du comportement qui en résultent.

Remplacement : L'utilisation d'animaux pour nos travaux est rendue nécessaire par la complexité de l'environnement cortical qui ne peut pas être recréé par des approches *in vitro* ainsi que par la nécessité d'une étude du comportement.

Réduction : Toutefois, nous garderons à l'esprit notre responsabilité de diminuer au maximum le nombre d'animaux tout en atteignant la significativité statistique. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, aucune nouvelle expérience ne sera effectuée avant qu'une analyse complète des précédentes n'ait été réalisée. Ainsi, le nombre total de souris gestantes utilisées pour ce projet est estimé à 25 femelles gestantes et à un maximum de 100 souriceaux positifs qui deviendront adultes pour les analyses comportementales soit 125 animaux au total.

Raffinement : Nous prendrons en compte avec la plus grande attention le bien-être de nos animaux. L'élevage et la reproduction de nos animaux se font dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress pour l'animal. Durant l'expérimentation, les femelles gestantes sont anesthésiées par voie gazeuse. Nous limitons le temps de manipulation sur l'animal anesthésié. Un anti-inflammatoire non-stéroïdien est injecté pendant l'opération par voie sous-cutanée et est également ajoutée dans le biberon pendant 2 jours après la chirurgie. L'animal se réveille dans une cage chauffée à 35°C et sera surveillé régulièrement. Nous vérifions que les animaux mangent et s'abreuvent normalement. Les jours suivants, les animaux sont surveillés deux fois par jour pour voir notamment si la plaie a besoin de soins et pour détecter d'éventuelles infections post-chirurgicales ou autres complications. L'objectif est de prévenir toute douleur ou détresse. En cas d'infections importantes ou de douleur manifeste, les dispositions nécessaires seront mises en œuvre.

7008. La trisomie 21 (T21), aussi appelé Syndrome de Down (DS), est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 2000 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. C'est la forme la plus fréquente de retard mental, qui est également associée à un large panel de dysmorphologies. Arriver à déplacer de quelques dizaines de points le quotient intellectuel des patients T21 leur permettrait d'avoir une vie plus autonome et socialement intégrée et constituerait un progrès très important pour la qualité de vie des patients et de leur entourage. La finalité de la recherche sur la T21 est donc de parvenir à mettre au point un traitement améliorant, puis normalisant, les fonctions intellectuelles des malades. Une société pharmaceutique partenaire propose des molécules ayant la propriété d'améliorer les capacités cognitives qui sont altérées dans cette pathologie.

Durant ce projet, il s'agira donc de mesurer la toxicité des molécules synthétisées et d'évaluer la dose qui permettrait de restaurer des fonctions intellectuelles aux animaux présentant un déficit. Les molécules seront testées chez la souris, animal pour lequel il existe plusieurs modèles de trisomie 21. Le remplacement de l'animal par des techniques *in vitro* est impossible car l'évaluation des performances intellectuelles et du comportement ne peut se faire que sur un organisme entier.

Ainsi, ces composés seront administrés à des souris contrôles puis à des modèles murins de la trisomie 21, qui feront l'objet de différents tests biologiques afin de mesurer : l'effet du mode d'administration, la distribution des molécules, la métabolisation et la toxicité pour *in fine* leur faire passer des tests de comportement en vue de détecter ou non une amélioration de leur performance intellectuelle.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, un minimum de 60 souris par composé à tester est requis. L'effectif est optimisé afin d'éviter toute duplication expérimentale et respecte ainsi la « réduction » de la règle des 3R. Ainsi, nous devrions utiliser un maximum de 1984 souris environ sur 2 ans.

Les souris bénéficieront d'un suivi quotidien à partir du début de leur traitement jusqu'à la fin de l'expérience. Dans le cas où les animaux présenteraient des signes de souffrance, une vétérinaire disponible sur le site interviendra pour s'assurer de leur bonne santé. Ainsi la règle du raffinement est appliquée tout le long du projet.

7009. L'hormone minéralocorticoïde aldostérone (aldo) régule la réabsorption rénale de sodium et joue un rôle majeur dans le contrôle de la volémie et de la pression artérielle. L'aldo exerce ses effets dans le néphron distal via le récepteur minéralocorticoïde (RM), un récepteur nucléaire qui est un facteur de transcription dépendant des ligands. Le RM est également exprimé dans des cellules non-épithéliales comme les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et musculaires lisses et les macrophages.

L'aldo et le RM jouent un rôle direct ou indirect important dans plusieurs pathologies, indépendamment des effets sur les transports ioniques rénaux de l'aldo. De nombreuses études cliniques et expérimentales animales ont démontré l'implication du couple aldo/RM dans les pathologies cardiovasculaires (insuffisance cardiaque, hypertension, infarctus du myocarde, syndrome métabolique) attestés par les effets bénéfiques induits par l'administration d'antagonistes du RM (spironolactone, éplérenone).

Dans le rein, les antagonistes sont bénéfiques dans différents modèles de pathologies rénales et réduisent la progression vers l'insuffisance rénale terminale, sans que l'on connait très bien les mécanismes (hémodynamique, inflammation, fibrose) ou les types cellulaires (endothelium, cellules musculaires lisses, macrophages) qui sont impliqués. Le modèle expérimental de néphrectomie subtotalaire est communément utilisé pour induire une insuffisance rénale modérée progressive chez les rongeurs. Les antagonistes du RM ont fait la preuve de leur efficacité dans ce modèle.

Par ailleurs, les comorbidités cardiovasculaires de l'insuffisance rénale sont dramatiques et impactent la survie des patients. Il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents du « crosstalk » entre rein et cœur par exemple ou rein et métabolisme, mais également d'identifier des thérapeutiques permettant de limiter ces comorbidités. Notre hypothèse est que le RM joue un rôle central dans ces comorbidités cardiovasculaires.

L'objectif du projet est de comprendre :

- 1- Les effets de nouveaux antagonistes non-stéroïdiens ayant moins d'effets secondaires délétères dans l'insuffisance rénale en particulier l'hyperkaliémie.
- 2- les mécanismes et types cellulaires impliqués dans les effets délétères de l'activation du RM et les effets protecteurs des antagonistes du RM sur la progression de l'insuffisance rénale chronique.
- 3- le rôle de l'activation du RM dans l'impact cardiovasculaire et métabolique de l'insuffisance rénale chronique.

Pour ce faire, une insuffisance rénale chronique par néphrectomie subtotalaire sera établie dans plusieurs modèles de souris transgéniques avec inactivation conditionnelle du RM dans des cibles de l'aldostérone (cellules endothéliales et musculaires lisses, cardiomyocytes, adipocytes, macrophages) et les phénotypes cardiovasculaires, métaboliques, rénaux et inflammatoires seront analysés. Par ailleurs de nouveaux antagonistes non stéroïdiens obtenus dans ce cadre de collaborations industrielles seront testés dans ce modèle de néphrectomie subtotalaire, en comparaison avec un antagoniste de référence.

D'après notre expérience dans des modèles animaux proches de ce modèle et en se basant sur la littérature, nous aurons besoin d'un groupe de 10 souris par modèle transgénique pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier les différents résultats (un total de 520 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans). Nos modèles de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact de l'insuffisance rénale sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier. Les protocoles thérapeutiques et les critères d'interruption d'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de l'étude.

7010. La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable qui, en raison du vieillissement croissant de la population, est devenue un réel problème de santé publique. Les recherches thérapeutiques jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier une cible pertinente. Tout au plus les traitements prescrits permettent de modérer les symptômes mais en aucun cas de stopper durablement l'évolution des lésions cérébrales et le déclin cognitif des patients. De nouvelles thérapies sont actuellement en cours de développement mais il est vraisemblable que ces thérapies devront être administrées aux premiers stades de la maladie pour un maximum d'efficacité. Il est donc important de découvrir des méthodes de diagnostic précoce de la maladie, applicables à un grand nombre de patients.

Aujourd'hui, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est l'examen complémentaire le plus utilisé en routine clinique pour observer le cerveau des patients d'Alzheimer. Les anomalies détectées par cette méthode (atrophie cérébrale) ne reflètent cependant qu'un stade relativement tardif de la maladie.

Les plaques amyloïdes et les dégénérescences neuronales qui constituent les lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer apparaissent plusieurs décennies avant les premiers symptômes de la maladie. Être capable de détecter ces lésions par IRM aurait un impact fort pour permettre d'initier les futures thérapies de façon précoce. Au cours de nos travaux précédents, nous avons développé des molécules (anticorps de camélidés), capables de pénétrer spontanément dans le cerveau et de se fixer sur les plaques amyloïdes et les dégénérescences pour les rendre visibles par IRM. Dans ce projet, nous proposons de développer plus avant ces molécules aux propriétés uniques.

Nous étudierons en détail les propriétés biologiques de nos anticorps et leur capacité à détecter les lésions *in vivo*. Ces travaux permettront d'initier le transfert en clinique de ces composés pour le diagnostic chez l'Homme. Dans un premier temps des études seront réalisées chez la souris avec une technique particulière appelée microscopie biphotonique : la "souris Alzheimer", qui développe des plaques ou des dégénérescences, reçoit par voie intraveineuse des anticorps de lamas qui peuvent pénétrer dans le cerveau pour se fixer ensuite aux lésions. Pour peu que ces anticorps soient couplés à une molécule fluorescente on peut les visualiser par microscopie chez la souris vivante et anesthésiée lorsqu'elle est placée sous l'objectif du microscope. Cette technique utilisée chez le petit animal est essentielle pour le développement de nouveaux marqueurs de la maladie d'Alzheimer. Elle a notamment permis dans le passé de développer de nouveaux marqueurs des plaques en imagerie nucléaire (scanner TEP) qui sont disponibles maintenant pour des études chez l'homme.

L'imagerie biphotonique est donc un préalable essentiel pour nos études des anticorps de lamas. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 150 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) remplacement, seules des études *in vivo* sur des modèles de souris Alzheimer permettent d'obtenir les informations requises : les anticorps pénètrent-ils dans le cerveau quand ils sont injectés par voie veineuse? Sont-ils capables de marquer les lésions caractéristiques de la maladie ? 2) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit (30 animaux / an) et permettra néanmoins de générer des données d'intérêt ; 3) raffinement, les procédures impliquent l'anesthésie des animaux lors de la procédure d'imagerie ;

7011. Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'astrocytes. Alors que le rôle des premiers dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, l'implication des astrocytes et leurs interactions avec les neurones dans le contrôle des fonctions cérébrales dans un contexte normal ou pathologique restent très peu connus. Tel est précisément le but de ce projet.

Ce projet vise à étudier le fonctionnement cérébral sensoriel impliquant la compréhension des capacités visuelles qui ne peuvent être étudiés que chez l'animal entier.

Sur ces 7 jours de projet nous utiliserons un total de 16 souris. Nous effectuerons sur les mêmes souris un test d'acuité visuelle, des enregistrements de l'activité physiologique de la rétine en réponse aux stimuli visuels ainsi qu'une analyse des couches cellulaires de la rétine. Ces différents niveaux d'analyses impliquent une "réutilisation" des animaux qui permettra de réduire leur effectif tout en minimisant la variabilité inter-animaux.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3) Ce projet de neurosciences implique une analyse comportementale déjà bien caractérisée chez la souris. Le suivi longitudinal des animaux opérés permettra de réduire le nombre de souris utilisées.

7012. Depuis longtemps, l'immunité innée a été considérée comme étant une première ligne de défense contre le cancer en s'activant au contact des molécules spécifiques exprimées à la surface des cellules tumorales. Cependant, les cellules tumorales développent des mécanismes induisant une inhibition des composants sériques de l'immunité innée et échappent à leurs effets cytotoxiques.

De récentes études ont démontré que l'activation du complément (composant sérique centrale de l'immunité innée) au sein du microenvironnement tumoral peut promouvoir le développement de cancer. L'activation du complément peut induire un état d'inflammation chronique, favoriser un microenvironnement immunosuppresseur, stimuler l'angiogenèse

et activer des voies de signalisations favorables au développement tumoral. Les mécanismes liés à ces phénomènes sont encore mal compris. L'objectif de ce projet est d'analyser *in vitro* et *in vivo* le rôle du complément dans le développement tumoral et la néovascularisation. Nous aborderons ces questions par des études sur des modèles cellulaires *in vitro*, et *in vivo* par des études de développement tumoral. Nous disposerons de souris *C57BL/6* wild type et invalidées pour des gènes du complément. Les résultats de ce projet permettront l'identification de cibles thérapeutiques parmi les composants du système du complément. Toutes les expérimentations seront anticipées à l'avance et l'application des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respecté dans ce projet. Les expériences *in vitro* utilisant des lignées cellulaires tumorales ont été réalisées et utilisées pour la mise en place de ce projet d'expérimentation sur animaux. Les applications *in vitro* ne permettent pas de répondre entièrement à nos objectifs car des cellules isolées ne peuvent refléter la complexité du système immunitaire, de la vascularisation et du microenvironnement tumoral. L'expérimentation animale est ainsi nécessaire afin d'étudier ces interactions complexes au sein d'une tumeur et de chercher des cibles thérapeutiques. Les souris ont été choisies comme modèle expérimental car il existe différentes lignées génétiquement modifiées pour les protéines du complément notamment C1q. Des analyses statistiques ont été effectuées afin de déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs. Ce projet d'une durée de 5 ans nécessitera l'utilisation de 600 souris. Chaque expérimentation sera optimisée afin d'obtenir un maximum de résultats de chaque animal tout en respectant les bonnes pratiques (taille tumorale, infiltrat immunitaire, prélèvement de la tumeur et de la rate, présence de métastases et prélèvement sanguin). Des points limites seront identifiés afin d'éviter toute souffrance inutile.

7013. Il a été démontré et publié que, en cancérologie, plus de 45% des candidats médicaments testés favorablement pour leur efficacité chez les rongeurs, par les méthodes classiques, donnent des résultats décevants chez l'Homme, dès la phase I des essais cliniques.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au-delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques. L'étude de ces candidats médicaments permettra de définir leur efficacité antitumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Chaque étude de pharmacologie expérimentale sur modèles établis de xénogreffes de tumeur dérivée de patient ou PDX, impose de disposer d'animaux donneurs de tumeurs. La qualité de ces tumeurs dites « respirantes » et des fragments (ou greffons) qui en sont obtenus, ont un impact important sur le taux d'inclusion en étude, donc sur la quantité d'animaux nécessaire à la réalisation de l'étude.

L'objectif de ce projet est de maintenir et d'entretenir des modèles de PDX en vue de leur utilisation dans des études de pharmacologie expérimentale.

Les modèles de tumeurs développés peuvent être congelés sous forme dite « revivifiable » afin d'éviter de devoir les maintenir à long terme sur animaux et ainsi réduire l'utilisation d'animaux au minimum.

La planification d'une étude nécessite la décongélation du modèle sélectionné et sa greffe sur des animaux receveurs. Le nombre d'animaux utilisés à cette étape est strictement adapté, modèle par modèle afin d'obtenir au minimum 2 tumeurs en croissance après la décongélation. Ce sont l'ensemble des données historiques recueillies sur de nombreuses années ainsi que la connaissance de nos modèles qui permettent d'anticiper le nombre d'animaux juste et nécessaire. Le taux de prise de greffe à cette étape de décongélation est en général inférieur au taux de prise de greffe observé lors d'une greffe à partir d'une tumeur respirante et défini lors du développement du modèle. Les fragments obtenus des tumeurs de ces animaux seront greffés sur de nouveaux animaux receveurs pour amplifier le modèle. Le nombre d'animaux utilisés sera de nouveau strictement adapté, modèle par modèle, afin d'obtenir le nombre de tumeurs nécessaires à la réalisation de l'étude de pharmacologie planifiée.

Pour résumer 2 étapes sont nécessaires à l'obtention de greffons en vue d'une étude :

Une première phase de décongélation-croissance tumorale.

Une deuxième phase d'amplification-croissance tumorale qui permettra d'obtenir le bon nombre de fragments de qualité nécessaires.

Le projet de maintien des modèles de xénogreffes nécessitera 3744 animaux sur 2 ans.

Des points limites seront identifiés afin d'éviter toute souffrance inutile.

7014. Dans le cadre de nos projets avec l'industrie pharmaceutique, nous sommes amenés à évaluer des principes actifs fournis et créés par celle-ci et qui ont pour but de réduire la perte osseuse car peu de société avec ces caractéristiques dans des cas d'ostéoporose. Ces principes actifs doivent sensiblement réduire la perte osseuse et induire moins d'effets secondaires que les composés existant sur le marché. L'objectif du projet est d'évaluer l'effet de différents principes actifs sur la perte osseuse induite par ovariectomie chez la souris. Ce modèle mime la pathologie humaine. La procédure concerne l'analyse des principes actifs chez des souris *C56BL/6* femelles âgées de 7 semaines à leur réception. Ces souris seront ovariectomisées pour induire une perte osseuse via l'absence d'œstrogènes. 10 animaux par groupe seront étudiés afin d'obtenir des résultats qui soient statistiquement comparables et qui permettent d'apporter des conclusions fiables qui ne peuvent être remis en question ce qui nécessiterait la réalisation d'un nouveau protocole pour confirmer les résultats. En plus des groupes impliquant les traitements avec les principes actifs, un groupe sham non opéré, un groupe ovariectomie traité avec le véhicule et un groupe ovariectomie traité avec un produit de référence seront ajoutés aux protocoles. Les animaux « sham » sont des animaux pour lesquels la chirurgie est réalisée dans les mêmes conditions que

les animaux ovariectomisés sauf que les ovaires sont maintenus en place. Il y aura au maximum 1500 souris. Par étude, une moyenne de 100 animaux sera étudiée et ceux-ci seront répartis dans 10 groupes de traitement (1 groupe témoin, 2 groupes traités avec véhicules, 1 groupe traité avec le produit de référence et 6 groupes traités avec les principes actifs). Selon l'historique de la société, ce type d'étude est réalisé 3 fois par an. Donc sur 5 ans, 1500 animaux seront nécessaires. Les animaux subissent une ovariectomie bilatérale à J0. Les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole et les traitements sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. Le produit de référence utilisé dans les protocoles est un bisphosphonate (Alendronate) qui est utilisé comme traitement chez les patientes ostéoporotiques. Il sera administré 2 fois par semaine par injection sous-cutanée. Selon le protocole défini avec le partenaire et le plus adapté à son composé, des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple. Afin d'évaluer la vitesse de néoformation osseuse dans les membres inférieurs, les animaux recevront une double injection de fluorochromes par voie sous-cutanée avant leur euthanasie (4 et 14 jours avant mise à mort). La durée de la procédure est de 2 mois. A l'issue du protocole animal, les souris seront euthanasiées et les membres inférieurs sont prélevés pour une analyse en imagerie et en histologie. Les utérus seront également pesés afin de vérifier la déficience en œstrogène générée par l'ablation des ovaires. Les ovariectomies et les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie gazeuse (mélange air/Isoflurane). L'ovariectomie entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période préopératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard si nécessaire). Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement euthanasié. Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont en général testés *in vitro* au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats statistiquement utilisables avec des tests statistiques non-paramétriques (Réduction). La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement).

7015. Dans le cadre de ses projets, notre société peut être menée à réaliser des études toxicologiques, études précliniques réglementaires répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation) ou des études préliminaires aux études réglementaires. L'objectif du présent projet est d'évaluer la biodistribution et à déterminer la cinétique ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination et Toxicité) de principes actifs administrés chez des rongeurs.

2 procédures font l'objet de la demande d'autorisation. La première procédure concernera l'administration des composés par voies parentérale et orale alors que la deuxième procédure concernera l'implantation de dispositifs médicaux délivrant des principes actifs en intramusculaire, sous-cutanée, dans des défauts osseux ou par fusion vertébrale.

Quelles que soient les procédures, les principes actifs peuvent être recherchés au niveau systémique, urinaire, fécal et dans différents organes. Selon les composés évalués, la nature des prélèvements sera modulée. En parallèle, une analyse histopathologique peut être réalisée sur certains organes afin de confronter les résultats de la biodistribution et de l'observation des lésions histologiques sur les organes étudiés.

Ces études permettront d'améliorer les schémas thérapeutiques d'administration des composés et de définir les métabolites à rechercher pour les études de toxicologie réglementaires ultérieures.

Un total de 2000 animaux (rats ou souris) maximum sera susceptible d'être utilisé sur les 5 ans du projet.

Quelle que soit la procédure, les animaux sont suivis cliniquement tout au long du protocole. Les traitements sont appliqués selon les schémas thérapeutiques spécifiques aux principes actifs étudiés. De même, un produit de référence pourra être utilisé et choisi pour correspondre au mieux aux principes actifs étudiés ; dans ce cas son schéma thérapeutique spécifique sera appliqué à ces nouvelles molécules. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de principe actif dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique par une analyse NFS par exemple.

La durée des protocoles varie en fonction des procédures et des principes actifs étudiés allant de 15 jours à 6 mois.

Les animaux peuvent être sacrifiés à différents points de cinétiques au cours du protocole, déterminés selon la nature des principes actifs étudiés.

A chaque euthanasie, une analyse macroscopique des cadavres et des organes à prélever sera réalisée.

Ces études seront menées dans le respect de la règle des 3R. Les principes actifs sont généralement testés *in vitro* au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessiter la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction).

Lors des implantations des dispositifs médicaux, la douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile.

Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et euthanasiés.

Les animaux seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de les maintenir dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement médicamenteux choisi selon la nature de la détresse, sera appliqué.

7016. L'obésité est un problème majeur de santé publique au niveau mondial. Plusieurs études menées chez l'animal ont mis en évidence le rôle des sels biliaires (SB) dans la régulation du métabolisme énergétique en activant le récepteur membranaire TGR5 (de l'anglais « Takeda G-protein-coupled receptor 5 ») au niveau périphérique. L'hypothalamus est une structure du système nerveux central ayant un rôle clé dans le contrôle de la balance énergétique (BE). Fait intéressant, le récepteur TGR5 est également exprimé dans l'hypothalamus suggérant sa potentielle implication dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Dans ce projet, nous évaluerons la présence du système de signalisation des SB dans l'hypothalamus de la souris, ainsi que le type cellulaire qui l'exprime, aussi bien chez des souris consommant une nourriture standard (Chow) que chez des animaux obèses soumis à un régime hyperlipidique (HFD, « high-fat diet»). Dans un second temps nous évaluerons la fonctionnalité du système par des analyses *in vitro*, puis *in vivo* en regardant les effets de la stimulation de TGR5 sur l'activation des voies intracellulaires de signalisation cibles de ce récepteur. La régulation de la BE par l'hypothalamus engage des mécanismes impliquant notamment le système de la mélanocortine, composé entre autres par les neurones à POMC (pro-opio-mélanocortine) et à NPY/AgRP (neuropeptide Y/Agouti-related peptide). Dans le but de mettre en évidence la capacité des SB à moduler ce système, nous utiliserons des souris transgéniques POMC-YFP (exprimant une fluorescence spécifique dans les neurones à POMC) pour déterminer (par électrophysiologie) l'activation de ces neurones par des agonistes de TGR5. Nous caractériserons également les effets de l'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.), aiguë et chronique, d'agonistes sélectifs de TGR5 sur le comportement alimentaire et l'état métabolique global. Nous prévoyons d'utiliser 380 souris mâles : 370 C57BL/6J pour réaliser des études pharmacologiques, comportementales, métaboliques et moléculaires ; 10 souris POMC-YFP pour les études d'électrophysiologie.

L'ensemble des procédures proposées est en conformité avec les directives européennes 2010/63/UE et françaises, dans le respect des nouveaux standards de soin et de bien-être des animaux, appliqués dans notre unité INSERM : hébergement en cages individuelles, régulation de la température, de l'hygrométrie et enrichissement des cages en conformité avec la réglementation d'une animalerie conventionnelle sous le contrôle d'un vétérinaire. Les recherches seront réalisées en accord avec les recommandations institutionnelles de traitement des animaux. Le maximum d'efforts sera fait pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter des répétitions non nécessaires. Des calculs statistiques de puissance ont été utilisés pour réduire le nombre d'animaux permettant d'obtenir une différence significative. Les études *in vitro* ne pourraient cependant pas remplacer l'utilisation d'animaux, étant donné l'aspect comportemental du projet. Enfin, le modèle animal choisi est en accord avec la bibliographie scientifique.

7017. La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique par un ralentissement moteur et des tremblements. Au niveau cérébral, les symptômes ont été associés avec la dégénérescence des neurones dopaminergiques et l'agrégation de la protéine alpha-synucléine. De nouvelles preuves suggèrent fortement la transmission de cellule à cellule de l'alpha-synucléine mal repliée comme un mécanisme pathogénique dans la maladie de Parkinson. Ce mécanisme, aujourd'hui mal compris, est considéré comme central dans l'évolution de la maladie. Sa compréhension est donc essentielle à l'identification d'un nouveau composé thérapeutique. Pour la microscopie, lors de l'analyse des tissus, l'opacité des tissus empêche la visualisation de structures cérébrales profondes sans découpe du cerveau.

Les nouveaux procédés de clarification (ou d'éclaircissement) des tissus biologiques permettent maintenant d'étudier le cerveau sans avoir à altérer ou modifier sa morphologie globale. Le procédé de clarification permet, par l'intermédiaire de protéines fluorescentes, de mettre en évidence les connexions entre les structures du cerveau. L'utilisation de ce procédé pour étudier la propagation de la pathologie associée à l'alpha synucléine permettrait des avancées dans la compréhension de la dynamique de cette pathologie. En effet, l'identification de l'alphasyneucléine dans les différentes « voies » visualisées par la fluorescence nous permettra de comprendre comment cette protéine se déplace dans le cerveau. Pour cela, des rats recevront une injection par stéréotaxie d'un virus adéno-associé permettant l'expression de l'alpha-synucléine humaine mal repliée dans les neurones dopaminergiques. Après euthanasie des animaux la présence de l'alpha-synucléine sera mise en évidence avec des molécules fluorescentes dans les différentes structures cérébrales où elle se sera propagée.

À titre de contrôle, les mêmes expériences seront reproduites sur un groupe d'animaux avec un virus permettant l'expression d'une protéine fluorescente non impliquée avec les processus pathologiques en cours dans la maladie de Parkinson pour vérifier la capacité migratoire de l'alpha-synucléine. Afin d'observer la dynamique de propagation de ce processus pathologique, les animaux seront euthanasiés 1 et 4 semaines après la chirurgie stéréotaxique, temps qui correspondent à l'initiation et la fin de la dégénérescence des terminaisons dopaminergiques.

La nécessité de voir le cerveau dans son ensemble nous oblige à utiliser des animaux, les modèles *in vitro* actuels ne pouvant répondre à notre question. Dans un souci de respect du R de réduire, nous utiliserons 64 rats pour ce projet, ce qui nous permettra de limiter la variation interindividuelle et de pouvoir mener en parallèle plusieurs techniques d'exploration du tissu cérébral par clarification. Dans le respect du R de raffiner, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux.

7018. L'objectif général du projet est d'apporter une meilleure compréhension anatomo-fonctionnelle du traitement neuronal de l'information visuelle de l'œil jusqu'au cerveau. Grâce à des techniques d'imageries ultrasonores innovantes, il sera possible d'imager l'activité de la rétine, du cortex visuel ainsi que du thalamus et du LGN (Lateral Geniculate Nucleus) suite à une stimulation visuelle donnée. Décrire avec précision le fonctionnement de la chaîne visuelle chez le primate non humain permettra d'obtenir des informations cruciales pour un meilleur diagnostic des pathologies visuelles chez l'Homme. Ces connaissances du traitement neuronal pourront être extrapolées à de nombreux processus cognitifs. Ce projet a également pour but de prouver l'efficacité d'une méthode de restauration visuelle développée au sein de notre institut : l'implant rétinien. Comparer les réponses cognitives obtenues pourra également permettre la compréhension et l'amélioration de cette approche innovante.

Pour la globalité du projet 18 primates non humains seront nécessaires (4 primates supplémentaires en remplacement peuvent être ajoutés si les premiers ne permettent pas d'obtenir des résultats exploitables) et ce, tout en optimisant les méthodologies utilisées afin d'assurer le bien-être des animaux ainsi que la pérennité du projet (réduire, raffiner et remplacer). De plus, les développements et améliorations des outils d'imagerie et de restauration visuelle utilisés au cours de cette étude, permettront d'effectuer des tests cliniques chez l'Homme et pourront à terme bénéficier à de nombreux patients.

Parmi les 18 primates utilisés, 10 proviennent de la fin de divers projets et sont destinés à être euthanasiés. Après accord et validation du vétérinaire et uniquement si cet avis est favorable nous préférons donc les récupérer (avant l'euthanasie) pour réaliser des expériences d'imagerie ultrasonore fonctionnelle et ainsi augmenter le nombre d'individus dans notre population sans augmenter le nombre de primates non humains réellement intégrés à notre projet.

Pour toute intervention chirurgicale, le singe est tranquilisé dans sa cage. L'animal est ensuite profondément anesthésié (respiration assistée). Un analgésique est systématiquement administré si la procédure peut induire une douleur transitoire chez l'animal.

Les techniques permettant de déterminer une activité cérébrale (IRMf, ultrasons fonctionnels ultrarapides et les mesures d'électrophysiologie) ont été développées afin de pouvoir être utilisées chez chacun des primates (avec un minimum de chirurgies requises), et ainsi réduire le nombre nécessaire d'animaux, tout en limitant le nombre de phases critiques.

Des premiers essais *ex-vivo* des implants rétiens sur des rétines ont déjà pu démontrer leur efficacité. De plus, la technique d'imagerie ultrasonore fonctionnelle ultrarapide a également pu montrer son intérêt sur le modèle rat. Enfin, certains primates récupérés et destinés à être sacrifiés seront également utilisés lors de ce projet.

7019. L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'effet anti-tumoral de l'association d'un médicament couramment utilisé en cardiologie, la Trinitrine, à un agent stimulant le système immunitaire dans les cancers du poumon. Le but est de montrer que cette association induit une forte activité anti-tumorale seule ou associée aux chimiothérapies utilisées dans les cancers du poumon. L'objectif final étant de pouvoir rapidement utiliser ce traitement en clinique.

L'intérêt de cette étude est grand, puisqu'il a été déjà observé chez l'Homme que l'utilisation de la Trinitrine améliorait considérablement les traitements par des chimiothérapies standards chez des patients porteurs de cancer du poumon. Cet effet anti-tumoral semble dépendant de la présence des cellules immunitaires. Cette étude visera donc dans un premier temps à mettre en évidence le type de cellules immunitaires nécessaire à cet effet anti-tumoral puis à remplacer ou réduire les chimiothérapies par un agent stimulant le système immunitaire.

Nous analyserons donc l'effet de la Trinitrine associée à un agent stimulant le système immunitaire dans la progression des tumeurs sous-cutanées d'origine pulmonaire (LLC1), chez la souris *C57BL/6*.

Le modèle murin proposé permettra d'analyser les interactions entre les cellules cancéreuses et les différentes composantes du système immunitaire empêchant le remplacement des souris par des modèles *in vitro*.

Pour cette étude, 210 souris *C57BL/6*, seront utilisées pour suivre la progression de tumeurs sous-cutanées, et évaluer l'impact de ces combinaisons sur le recrutement et l'activité des cellules immunitaires. Ces souris seront réparties par groupes de 5 individus nous permettant d'obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs comme nous l'ont démontré des études précédentes. La lignée de cellules tumorales de souris LLC1 sera injectée par voie sous-cutanée. Les expériences de suivi de la progression tumorale ainsi que celles permettant l'identification de la nature des cellules immunitaires seront réalisées 3 fois pour permettre l'obtention de résultats statistiquement fiables. La croissance des tumeurs sous-cutanées sera évaluée par mesure du volume tumoral à l'aide d'un pied à coulisse, les souris seront euthanasiées 25 jours après injection des cellules tumorales, ou lors de signes de souffrance ou lorsque le volume tumoral atteint 1500 mm<sup>3</sup>.

Des études préalables nous ont permis de définir les points limites les plus précoces possibles afin d'éviter toute souffrance des animaux. Le test statistique Mann-Whitney et l'expérience du laboratoire nous ont permis de réduire les groupes d'animaux à 5 individus par groupe et de ne devoir répéter que trois fois les expériences pour la progression tumorale et pour la détermination de la nature des différentes cellules immunitaires.

7020. La sclérose latérale amyotrophique (SLA, ou maladie de Charcot) est une maladie neurodégénérative incurable caractérisée par une perte sélective et progressive des neurones moteurs. A l'image d'autres maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer, des dysfonctionnements mitochondriaux semblent être impliqués



dans les processus qui conduisent à la mort sélective des neurones moteurs. Rétablir les fonctions mitochondriales pourrait donc être une piste thérapeutique d'intérêt dans la SLA.

Il a récemment été montré que la protéine X du Bornavirus, avait des effets neuroprotecteurs dans un modèle toxique de la maladie de Parkinson en agissant à un niveau mitochondrial. Nous proposons ici d'évaluer le potentiel neuroprotecteur de la protéine X du Bornavirus dans un modèle murin et génétique de SLA.

Dans ce but, cette protéine sera administrée chez des souris *SOD1*. L'évolution de la maladie sera alors suivie par différentes techniques rendant compte de la progression de la maladie chez ces animaux : tests moteurs, enregistrements électrophysiologiques, immunohistochimie. Ces expériences seront réalisées sur 1056 souris mâles au total.

Afin de respecter la règle des 3 R, chaque groupe expérimental sera constitué du minimum d'animaux. Ainsi, et suivant les recommandations faites par les « Guidelines on preclinical models of ALS », chaque condition expérimentale testée concernera un lot de 12 animaux pour une interprétation statistique correcte des résultats. Il est également à préciser que l'ensemble des procédures sera réalisé suivant les gestes éthiques avec les technologies les moins invasives possibles.

7021. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond à un groupe de maladies d'évolution progressive caractérisée par une élévation anormale de la pression sanguine au niveau des artères pulmonaires, dont le symptôme principal est un essoufflement à l'effort chez l'homme. Selon la cause et la gravité, l'hypertension artérielle pulmonaire peut être une maladie sévère avec une tolérance à l'effort très nettement diminuée et une insuffisance cardiaque droite.

Il existe deux types d'HTAP : l'HTAP primitive qui est sans atteinte du cœur gauche et l'HTAP secondaire qui est consécutive à une insuffisance cardiaque gauche.

L'objectif de cette étude, à cheval sur les activités cardio-vasculaires et respiratoires du service, est de confirmer le fait que l'érythropoïétine en conditions de normoxie engendre les mêmes effets physiopathologiques que l'hypertension artérielle pulmonaire induite par l'hypoxie.

Dans ce modèle d'HTAP par exposition prolongée à des conditions d'hypoxie, la baisse de la pression partielle en oxygène (comme en altitude) entraîne des modifications structurales des vaisseaux pulmonaires : épaissement de la paroi des artères, réduction du nombre d'artéioles fonctionnelles, etc. La physiopathologie de ces modifications structurales fait intervenir différents effets cellulaires en réponse à l'hypoxie comme l'induction de gènes impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses et la production de matrice extracellulaire via la sécrétion accrue d'érythropoïétine (EPO) permettant une augmentation de la production de globules rouges dans le sang. Dans cette étude, nous allons administrer de l'EPO recombinante pour vérifier l'hypothèse que cette administration conduit à une HTAP sévère en condition normale d'oxygène via un recrutement de cellules souches endothéliales et nous allons comparer les résultats obtenus à des souris exposées à une hypoxie (10% d'oxygène au lieu de 21%) pendant 14 jours et 28 jours.

Ces différentes caractéristiques physiopathologiques seront évaluées à l'aide de techniques utilisées chez l'homme et qui sont adaptées ici à la souris. Ainsi l'hypertension au niveau des artères pulmonaires et l'insuffisance cardiaque droite sera appréciée par échographie cardiaque (comme chez l'homme) et confirmée par cathétérisme cardiaque droit (comme chez l'homme) ainsi que par histologie.

D'un point de vue pratique nous utiliserons des souris que nous utilisons habituellement au laboratoire.

REPLACEMENT : A ce jour, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de souris par des techniques alternatives pour étudier le développement de ces pathologies

REDUCTION : Dans l'élaboration de notre protocole, nous nous sommes attachés à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en permettant un traitement statistique des données pour pouvoir conclure : un effectif de 6 souris par conditions et temps d'analyses soit 36 souris.

Ainsi nous avons 6 groupes de 6 souris, répartis en 2 groupes placés dans des conditions d'hypoxie (10% d'oxygène) pendant 14 et 28 jours, 2 groupes traités par EPO par voie ip (intrapéritonéale) pendant 14 et 28 jours, 1 groupe placé dans des conditions normoxiques (21% d'oxygène, contrôles) ainsi qu'un groupe pour s'entraîner à réaliser le cathétérisme invasif ainsi que les prises de sang.

RAFFINEMENT : Avec ce protocole nous nous sommes attachés à éviter au maximum toutes formes de souffrance des souris impliquées. L'exposition des souris à des conditions hypoxiques ne provoque pas de souffrance. L'exploration échographique sous anesthésie ainsi que le cathétérisme invasif final ne provoquent pas de souffrance.

7022. L'ataxie de Friedreich (AF) est une maladie génétique, incurable à ce jour, affectant 1 personne sur 30 000, caractérisée par des atteintes neurologiques et cardiaques. La cardiomyopathie est responsable de la mort précoce de 60% des patients avant l'âge de 40 ans. L'AF est causée par un déficit cellulaire sévère en protéine frataxine (FXN), à un niveau équivalent à 5-30% du niveau normal. Ce déficit en FXN induit une altération primaire de la biosynthèse de cofacteurs, les noyaux fer-souffre, qui sont des cofacteurs essentiels pour de nombreuses fonctions biologiques, en particulier pour la mitochondrie. Ceci a pour conséquence la dysfonction des mitochondries qui produisent plus de 80% de l'énergie nécessaire à la contraction cardiaque et donc à la propulsion du sang dans l'organisme. Différentes molécules pharmacologiques, telles que des antioxydants, ciblant les conséquences secondaires du déficit en FXN ont été évaluées sans succès chez les patients.

Pour traiter la cause primaire de l'AF, nous avons développé une approche innovante de thérapie génique *in vivo*. Nous avons construit un vecteur viral recombinant thérapeutique, dont le matériel génétique virale a été remplacé par une

cassette d'expression codant pour la Fxn, afin de ré-exprimer la protéine FXN dans les cellules déficientes et y corriger les conséquences pathologiques.

Au cours d'une première étude, nous avons réalisé la preuve de concept de l'efficacité de cette approche en pré- et post-symptomatique dans le modèle de souris transgénique MCK qui constitue à ce jour le seul modèle animal reproduisant la cardiomyopathie hypertrophique associée à l'AF. Ici, le vecteur thérapeutique a été administré par voie intraveineuse permettant ainsi sa distribution dans toutes les cellules cardiaques.

Ensuite, une série d'études dose-réponse réalisées chez la souris nous a permis de montrer qu'il suffit de traiter 50-60% des cardiomyocytes et de restaurer au moins 56% du niveau normal protéique FXN, pour corriger la fonction cardiaque et la survie des souris.

Le projet proposé ici a pour objectif de finaliser le développement préclinique de notre protocole de thérapie génique cardiaque, en particulier d'optimiser le niveau d'expression cardiaque de notre vecteur thérapeutique pour restaurer un niveau quasi-physiologique de FXN *in vivo*. Pour cela, nous construirons plusieurs vecteurs candidats dont l'expression sera sous le contrôle de promoteurs plus faible que le promoteur CAG, ubiquitaire et fort, utilisé initialement.

Cette étude inclura 322 souris dont 226 MCK et 96 contrôles saines, en tenant compte du principe des 3R :

- En termes de REMPLACEMENT, les vecteurs candidats seront d'abord présélectionnés *in vitro* dans des lignées cellulaires d'intérêts, puis les 4 meilleurs candidats seront caractérisés *in vivo*.

- En termes de REDUCTION, les mêmes cohortes de souris seront utilisées pour réaliser les analyses fonctionnelles, histologiques, moléculaires et biochimiques.

- En termes de RAFFINEMENT, les souris MCK qui présentent un phénotype délétère, seront euthanasiées si leur état général se dégrade. Les procédures proposées sont pas ou peu invasives et seront réalisées sous anesthésie générale dans ce dernier cas.

7023. Ce projet a pour objectif de former des médecins sur un système innovant de fermeture percutanée des communications inter-auriculaires ostium secundum.

Les communications inter-auriculaires (CIA) représentent la malformation cardiaque la plus fréquemment observée chez l'adulte. Leur traitement a longtemps consisté en une fermeture chirurgicale mais, depuis environ 20 ans, le développement des techniques de cathétérisme interventionnel permet leur occlusion de manière sûre et peu invasive dès l'enfance (à partir de 10-15 kg).

Le projet a pour objectif de former et familiariser les médecins étrangers ayant accès depuis peu de temps à cette technologie à l'utilisation de ce dispositif dans l'objectif de leur permettre ensuite de fermer des CIA par voie percutanée de manière sécurisée une fois de retour dans leur pays d'origine.

La formation des médecins nécessite l'utilisation d'animaux. En effet, la mise en situation sur un animal vivant, en amont garantira l'optimisation de la procédure sur l'homme et ainsi éviter des risques inutiles.

Le nombre d'animaux sera réduit au minimum, notamment en faisant en sorte que plusieurs médecins utilisent le même animal. L'espèce Porc sera utilisée dans ce projet (2 animaux par session - une session de formation par trimestre, soit sur les 5 ans du projet 40 animaux) du fait de ses caractéristiques morphologiques et physiologiques similaires à l'Homme, notamment concernant l'anatomie cardiaque. La procédure de formation sera terminale (sans réveil), ainsi toutes les dispositions pour prendre en compte le bien-être des animaux, notamment par la mise en place de mesures dédiées, se feront de leur prise en charge initiale à la fin de l'expérimentation, qui s'effectuera sous anesthésie générale.

7024. Les accidents vasculaires chez les humains sont fréquents et doivent être traités rapidement et avec des méthodes performantes. Un accident vasculaire peut être dû à caillot appelé aussi thrombus. Il s'agit donc dans ce projet de comparer l'impact des différentes méthodes de thrombectomie (élimination du caillot) sur les parois des artères carotides, méthodes qui sont utilisées dans le cadre des accidents vasculaires chez les humains. Pour ce faire, nous utiliserons des porcelets d'environ 50 kg sous anesthésie générale. Les neurochirurgiens vont provoquer un accident vasculaire en injectant un thrombus par la veine fémorale du porcelet. Puis éliminer ce thrombus par 2 méthodes de thrombectomie différentes, à savoir la méthode "stent retriever" et la méthode de "thromboaspiration". L'étude s'effectuera sur des artères de porcelet de tailles comparables à celles des humains. A la fin de la thrombectomie, l'animal sous anesthésie générale, sera euthanasié puis les artères traitées seront prélevées. Une étude histologique sera effectuée sur les différents prélèvements pour mettre en évidence les éventuelles lésions des artères dues aux méthodes de thrombectomie.

Règle des 3 R :

Remplacer :

Ce projet s'effectuera sur des porcelets d'environ 4 mois (50 kg). Nous ne pouvons, à ce jour, remplacer la méthode *in vivo* par d'autre méthode n'utilisant pas d'animaux car cette étude nécessite un environnement physiologique intégré impossible à reproduire *in vitro*.

Réduire :

Ce projet nécessitera 2 lots de porcelets :

Le premier lot subira la thrombectomie sous anesthésie générale puis sera euthanasié au bout d'une heure (procédure sans réveil).

Le deuxième lot subira la thrombectomie sous anesthésie générale, sera réveillé. Des soins post-opératoires leur seront prodigués. Les porcelets seront soignés et suivis dans un établissement agréé. Puis au bout de 15 jours, ils seront remis

sous anesthésie générale pour la deuxième phase. C'est-à-dire l'anesthésie puis le prélèvement des artères traitées et l'euthanasie. Ce deuxième lot permettra de mettre en évidence, les éventuelles lésions qui pourraient apparaître entre le jour de la thrombectomie J0 et J+15.

Ce projet nécessitera au maximum 6 porcelets. (2 lots de trois : 1 ou 2 pour la procédure +1 de secours). Ce chiffre sera revu à la baisse et uniquement à la baisse afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner :

Les porcelets seront opérés dans les mêmes conditions que pour les humains. Ils seront prémédiqués (administration de calmants), puis mis sous anesthésie générale. Nous leur administrerons également des antidouleurs. Pour la procédure avec réveil, les porcelets recevront des soins post-opératoires (antibiotiques et anti douleur).

7025. Le cancer de la prostate, deuxième cause de décès par cancer chez l'homme, est une maladie hétérogène. Les outils diagnostiques actuels ne permettent pas d'identifier de façon précoce et fiable les patients qui développeront des tumeurs agressives et métastatiques. De surcroît, il n'existe pas de traitement ciblant de manière efficace les tumeurs métastatiques à l'origine du décès des patients. Afin d'améliorer les outils diagnostiques et de développer des approches thérapeutiques plus efficaces, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires du développement tumoral est donc requise.

L'objectif du projet est le suivi et la caractérisation de ces tumeurs afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques pour permettre aux industries pharmaceutiques de développer des molécules agissant à des stades précis du développement tumoral.

REMPACEMENT : Une stratégie privilégiée pour l'étude du cancer est l'utilisation de modèles animaux mimant le plus fidèlement possible la maladie humaine, les modèles cellulaires *in vitro* n'étant pas suffisants à la reproduction de la complexité biologique du cancer. Le laboratoire travaille sur des modèles génétiques murins permettant la génération précise et ciblée de tumeurs prostatiques aux caractéristiques très proches de celles observées chez l'homme.

REDUCTION : De nombreuses études faites auparavant sur le cancer de la prostate et sur ces modèles en particulier ont mené à une bonne connaissance du modèle et de la méthodologie appropriée, permettant ainsi la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées sur un nombre limité de cohortes et la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. Ainsi, ce projet sur cinq ans requiert un nombre total de 1800 animaux.

RAFFINEMENT : Le suivi est fait pendant un délai suffisant à l'apparition de métastases (os, foie, poumon etc.), permettant ainsi l'étude des mécanismes d'apparition des formes les plus agressives et létales du cancer de la prostate. Néanmoins, une attention particulière sera accordée aux animaux tout au long de leur vie, et les expérimentations seront soumises à des critères précis d'interruption, afin de veiller à ce que chaque animal évolue dans les meilleures conditions qui soient et sans souffrance.

7026. La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. Il est donc nécessaire de développer des modèles expérimentaux pertinents de dégénérescence rétinienne pour pouvoir ensuite tester l'efficacité de stratégies thérapeutiques applicables chez l'homme. Aucun système *in vitro* ne peut mimer une dégénérescence rétinienne et nous informer sur un effet de population de neurones dans la rétine, nous devons donc recourir à des modèles animaux. Nous proposons donc de développer un modèle animal préclinique ayant un phénotype de dégénérescence rétinienne.

Il existe un nombre très important de mutations responsables de dégénérescence rétinienne héréditaire, la Rétinite Pigmentaire étant la maladie génétique la plus hétérogène qui soit. Le problème de la diversité des gènes mutés, la diversité des mutations de ces gènes mais aussi des autres formes de la pathologie incitent à aborder un modèle préclinique mimant le mécanisme commun aux différentes formes de dégénérescences, en aval des mutations. Par exemple, toutes ces atteintes partagent la même voie terminale : l'activation du programme de mort cellulaire qui conduit à la perte des photorécepteurs. Nous proposons donc de créer un modèle 'général' de Rétinopathie Pigmentaire basé sur ce phénotype commun de perte de photorécepteurs. Pour ce faire, il est possible d'administrer une protéine phototoxique inductible au sein de cellules cibles de la rétine. L'illumination de cette protéine à une longueur d'onde spécifique conduira à l'invalidation des cellules dans lesquelles elle est exprimée. Cela permettra alors de mimer le dysfonctionnement de ces cellules dans la rétine d'animaux initialement sains et donc d'étudier la dégénérescence cellulaire et ses conséquences sur l'environnement rétinien. Ce modèle a pour avantage de récapituler le phénotype commun à l'ensemble des Rétinopathies Pigmentaires.

Pour ce projet on utilisera des primates non-humains, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'homme au niveau de l'œil, notamment de la rétine. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vitro* et chez le rongeur. Le nombre d'animaux (20) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Chaque animal est utilisé pour l'ensemble des étapes du projet, de l'injection intraoculaire au prélèvement des tissus d'intérêt pour l'analyse. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif (imagerie *in vivo* sur les animaux anesthésiés) minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Les actes chirurgicaux réalisés entraînant une douleur modérée, une observation régulière des animaux sera faite pour détecter tout signe de détresse, et si cela est jugé nécessaire, la douleur

postopératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les animaux seront hébergés en groupe, dans des conditions enrichies en favorisant les interactions sociales.

7027. Le canal sodique Nav1.5 est une protéine exprimée à la membrane plasmique des cellules musculaires cardiaques. Son rôle est essentiel dans l'initiation et la propagation d'un influx électrique appelé potentiel d'action, à l'origine de la contraction coordonnée des différentes cavités cardiaques. Une anomalie génétique sur le gène responsable de l'expression de Nav1.5 peut être à l'origine de graves pathologies cardiaques comme le syndrome de Brugada, le syndrome du QT long ou la maladie de Lenègre. En effet une expression altérée de ce canal peut conduire à des perturbations du rythme ou de la conduction électrique cardiaque au sein des cavités, pouvant dans les cas les plus graves conduire à un arrêt brutal du cœur appelé mort subite (France : 50 000 cas par an).

Avant la dernière décennie, l'étude de Nav1.5 concernait uniquement son rôle électrique dans les cellules musculaires cardiaques. Depuis, les chercheurs commencent à démontrer l'expression de ce canal dans d'autres types cellulaires et organes. Il a été montré une expression de Nav1.5 dans les fibroblastes cardiaques, les cellules musculaires intestinales, et également les cellules cancéreuses métastatiques du sein. L'éventuel rôle contractile de Nav1.5 dans ces types cellulaires est étudié, mais aussi son implication potentielle dans le remodelage du « ciment » intercellulaire, appelé matrice extracellulaire.

Notre équipe de recherche étudie les mécanismes physiopathologiques des troubles du rythme cardiaque, nous donnant une excellente connaissance électrique du canal sodique Nav1.5. Mais aux cours de travaux préliminaires, nous avons montré une expression de ce canal dans les poumons. Notre objectif est d'étudier l'expression, la localisation et le rôle fonctionnel de Nav1.5 dans les poumons chez la souris. Il s'agira dans ce projet de comparer différents paramètres respiratoires chez différents groupes de souris selon leur sexe et leur génotype grâce à deux lignées de souris transgéniques dont nous disposons dans notre laboratoire pour étudier Nav1.5. Pour chaque genre étudié, un groupe de souris sera dit « sauvage », tandis que l'autre groupe présentera soit une invalidation partielle, soit une mutation dite « perte de fonction » du gène responsable de l'expression de Nav1.5. Nous prêterons attention à la fonction cardiaque en parallèle, puisqu'il est avéré que des atteintes comme l'insuffisance cardiaque peuvent, par modification des débits sanguins, altérer les structures pulmonaires.

Pour ce projet, l'utilisation de 224 animaux est envisagée, en appliquant la règle des 3R :

- Remplacement : il n'existe pas de méthode de substitution adaptée, mais seules les procédures fonctionnelles indispensables seront effectuées.

- Réduction : Au cours de l'étude, des tests statistiques seront effectués nous permettant d'arrêter les expérimentations si le nombre de souris testé est suffisant pour la significativité des résultats. Plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux.

- Raffinement : La majorité des souris, en suivi longitudinal, ne subiront que des procédures non invasives. Le groupe de souris subissant une procédure invasive est réduite au maximum, et une couverture analgésique est prévue. Enfin un arbre décisionnel nous permettra une réaction rapide et adaptée en cas d'atteinte des points limites.

7028. L'objectif principal de notre équipe est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

Il s'agit d'une recherche préclinique.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous disposons de différents vecteurs (anticorps entiers, fragments, Affitins, liposomes, etc...), de plusieurs ligands et de plusieurs radioéléments.

Depuis des années notre équipe développe de nouveaux vecteurs qui sont testés sur différents modèles de souris porteuses de tumeurs.

Il est indispensable de tester ces nouveaux vecteurs sur ces mêmes souris pour pouvoir les comparer.

Les Affitins seront les objets de cette étude.

L'objectif de ce projet est de tester et d'évaluer la toxicité de ces nouveaux vecteurs qui sont des Affitins ciblant le myélome multiple (MM) et le cancer du sein humains en vue de traitements de radioimmunothérapie.

Etude 1 : Mesure de la toxicité de 2 Affitin-PE *in vivo* sur des souris non greffées.

Etude 2 : Mesure de l'activité anti-tumorale et de la toxicité au niveau du foie des Affitin-PE *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs.

Etude 3 : Effet de la radiothérapie externe seule ou associée aux Affitins sur les tumeurs sous cutanées de MM sur des souris porteuses de tumeurs.

Des points limites stricts de taille de tumeur conduisent à euthanasier les souris dès qu'ils sont atteints, de façon à éviter toute souffrance inutile.

202 souris seront nécessaires pour ces études.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme.

Nous appliquerons la règle des 3R : Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests *in vitro* sur les cellules tumorales qui ne peuvent suffire et permettre de connaître la distribution dans un système complexe qui est un être vivant.

Diminuer le nombre d'animaux nécessaires à nos études en développant l'imagerie pour les études de suivi thérapeutique. Le nombre de 202 souris prend en compte cette règle.

Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à une euthanasie compassionnelle.

7029. La dépression est la pathologie mentale la plus fréquente, dont les facteurs déterminant dans son apparition sont le stress chronique et la douleur chronique. Des données d'imagerie neuroanatomique et fonctionnelle chez l'homme ainsi que des résultats obtenus chez la souris par des méthodes de biologie moléculaire montrent que non seulement la dépression majeure, mais aussi les situations douloureuses, s'accompagnent de changements dans des structures limbiques du cerveau responsables des comportements anxio-dépressifs. Ces résultats ont été obtenus en utilisant deux modèles murins :

(1) un modèle de la dépression induite par la douleur neuropathique.

(2) un modèle de la dépression induite par l'utilisation de souris génétiquement modifiées (Thy1-ChR2-YFP) dont certains neurones présentent la caractéristique de pouvoir être activés par la technique optogénétique, une exposition à une lumière d'une longueur d'onde donnée.

Nous souhaitons approfondir ces observations, par un suivi longitudinal de ces deux modèles murins, en cartographiant les réseaux cérébraux intervenant dans le développement de la dépression. Pour cela, nous utiliserons l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et l'imagerie nucléaire (TEP), deux techniques d'imageries biomédicales non-invasives alliant ainsi la résolution spatiale et la multi-modalité de l'IRM à la sensibilité et la spécificité du TEP. De plus, l'utilisation de ces deux techniques d'imagerie déjà présentes dans les services cliniques en routine, nous permettent d'envisager un transfert de nos observations plus rapide vers l'Homme. Des tests comportementaux viendront compléter nos observations basées à partir des images.

Afin d'éviter des temps d'anesthésie trop longs au cours des examens d'imagerie, ce projet se découpera en 4 parties. Ces différentes parties aboutiront à des conclusions complémentaires les unes des autres, permettant la compréhension des structures impliquées dans la dépression. Ainsi, 160 souris de la lignée *C57BL/6J* pour le premier modèle et 80 souris génétiquement modifiées de la lignée *Thy1-ChR2-YFP* pour le second modèle seront utilisées.

Le projet sera conduit en respectant la règle des 3R visant à :

- Remplacement : L'étude portant sur les conséquences affectives de la douleur neuropathique et la dépression induite par l'activation optogénétique des neurones du cortex cingulaire antérieur (CCA), nécessite impérativement l'utilisation d'animaux. Réduire : Nous n'utiliserons le minimum de souris nécessaire pour pouvoir faire des études statistiques pour chaque modèle. L'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure. Un calcul statistique « power analysis » sera réalisé pour s'assurer que les résultats obtenus sont valides sur le plan statistique (multiple ANOVA). Ces données seront de plus corrigées par un test post-hoc de Bonferroni. Un test t de Student sera ajouté pour comparer les données à une valeur calculée du hasard.

- Raffiner : L'environnement des animaux sera enrichi par une zone de repos, du coton et de tunnels en papier ou plastique dans les cages. Les animaux seront hébergés de telle sorte à former des groupes sociaux. Des points limites seront prévus en cas d'urgence et s'ils sont atteints, une euthanasie compassionnelle sera réalisée pour abrégé toute souffrance.

7030. La mucoviscidose est une maladie héréditaire monogénique autosomique récessive grave affectant chaque année un nouveau-né sur 4200 en France. Nos travaux de recherche visent à mettre au point un traitement curatif pour cette maladie. Nous voulons ici évaluer l'efficacité de transfert de gènes *in vivo* de formulations, issues de nos recherches, et préalablement testées de façon approfondie en conditions *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner plusieurs formulations lesquelles représentent des candidates parmi les plus intéressantes à tester à l'heure actuelle. Dans le cas présent, les molécules testées correspondent à des lipides cationiques originaux et les cellules cibles sont les cellules épithéliales bronchiques. Ceci implique d'effectuer des tests en conditions *in vivo* afin de prendre en compte toutes les contraintes liées à la complexité des voies respiratoires pulmonaires lesquelles ne peuvent être reproduites en conditions *in vitro*. La méthode d'administration utilisée consiste à délivrer les formulations à tester sous la forme d'un aérosol pouvant être respiré. Les molécules testées peuvent ainsi interagir directement avec l'épithélium des voies respiratoires, en particulier avec les cellules cibles à traiter. L'espèce animale de référence pour ce type d'étude est la souris. En pratique, les animaux sont introduits pendant 30 à 45 minutes dans une chambre d'exposition où ils peuvent se déplacer librement (sans contrainte). Ils y respirent un aérosol formé à partir des agents de transfert de gènes à tester. Aucune anesthésie ou analgésie des animaux n'est nécessaire au cours de l'exposition à l'aérosol. De suite après cette exposition, les animaux sont replacés dans leur cage puis stabulés normalement, sans autre traitement, jusqu'à la fin du protocole. L'évaluation de l'efficacité du transfert de gènes est effectuée de deux manières, (1) au cours de la stabulation par imagerie de bioluminescence (sous anesthésie gazeuse) puis (2) en point final, c'est-à-dire sur des prélèvements effectués uniquement immédiatement après l'euthanasie des animaux.

L'administration par aérosol est une stratégie adaptée pour un traitement de maladies telle que la mucoviscidose ; elle pourrait être rapidement transposée à la clinique, en particulier du fait que le matériel utilisé pour générer l'aérosol (le nébuliseur) est déjà utilisé par des patients pour d'autres indications. Par ailleurs, le protocole utilisé est non-invasif c'est-

à-dire qu'aucun geste n'est pratiqué sur les animaux, lesquels restent vigiles tout au long de l'expérience. Enfin, la procédure ne génère pas ou peu de stress, ce qui impacte positivement la qualité des résultats obtenus en réduisant en particulier la variabilité liée à l'administration et donc le nombre d'animaux qu'il est nécessaire d'inclure, en bon accord avec la règle des 3R. Le nombre total d'animaux nécessaires pour la réalisation de ce protocole est de 315. Ce nombre est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Un test statistique non paramétrique sera utilisé afin de comparer l'efficacité des différentes formulations testées.

Les premières expériences ont démontré la grande efficacité de cette technique. Nous voulons ici évaluer si des administrations répétées permettent de maintenir ou d'augmenter l'efficacité de transfert de gènes *in vivo* de nos formulations.

7031. Nos projets sont centrés sur la régulation de la régénération du foie. La régénération du foie est indispensable à la guérison après hépatite sévère ou après ablation chirurgicale d'une partie du foie. L'étude des mécanismes qui gouvernent la régénération permettra de progresser dans le traitement des maladies aiguës et chroniques du foie. Ce processus très complexe implique une multitude de voies de signalisation et d'interactions cellulaires. Nous nous intéressons en particulier à deux voies de signalisation impliquant des récepteurs membranaires. L'ensemble de nos travaux nécessite la mise en place de modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* permettant d'étudier les différents facteurs régulant la prolifération hépatocytaire. Les modèles expérimentaux *in vivo* les plus utilisés pour étudier la réparation du foie chez la souris dans notre équipe, comme dans la littérature, sont l'hépatectomie partielle (ablation d'une partie du foie), l'induction de l'équivalent d'une hépatite et la ligature de la voie biliaire, sur une échelle de temps allant de quelques heures à 5 jours. Pour étudier la réparation chronique (développement de l'équivalent d'une cirrhose), sur une échelle de temps plus étirée (plusieurs semaines), nous réalisons également des ligatures de la voie biliaire et des traitements induisant l'équivalent d'une hépatite chronique. Nous disposons actuellement de plusieurs souches de souris génétiquement modifiées, déficientes pour les récepteurs membranaires que nous voulons étudier. Le déficit de ces récepteurs n'induit aucune anomalie spontanée ni souffrance chez les souris, mais nous étudions l'impact de ces récepteurs sur la régénération du foie dans nos différents modèles expérimentaux. Nous élevons aussi une souche de souris sauvages "contrôle". Ces souris sont indispensables à nos travaux, pour l'étude *in vivo* de la réparation du foie, ainsi que pour l'isolement des différentes cellules hépatiques ou extra-hépatiques et leur étude *in vitro*. Le caractère par définition intégré des processus que nous étudions ne permet pas le remplacement complet des modèles *in vivo* par des modèles *in vitro* qui ont cependant un caractère complémentaire indispensable à la compréhension fine des mécanismes de la régénération et de la réparation du foie. Les expériences *in vitro* sont pratiquées systématiquement à chaque fois qu'elles peuvent remplacer les expériences *in vivo*. Durant l'ensemble de nos études, nous nous efforçons de réduire le nombre d'animaux nécessaires et suffisants dans chaque groupe expérimental. Compte tenu de la variation « inter-animale » des réponses biologiques impliquées au cours des processus de régénération et de réparation du foie dans les modèles étudiés, un nombre optimal de 6 souris par groupe expérimental doit être, dans la plupart des cas, prévu. Notre recul ainsi que la littérature de notre domaine montrent que toute réduction de ce nombre produit des données dont l'analyse n'est pas solide. Nous optimisons l'étude des souris en cours et en fin d'expérimentation (multiples prélèvements d'organes et de fluides) de façon à ne pas répéter inutilement les expériences. Le nombre de souris utilisées dans l'extension de ce projet est estimé à environ 140, réparties dans des protocoles utilisant les différentes procédures : hépatectomies partielles (12 souris), ligature de la voie biliaire (20 souris), mesure de la sécrétion biliaire (40 souris), administrations de traitements (72 souris). Environ 100 souris sont maintenues en zone de reproduction.

Le raffinement de nos procédures consiste à : réaliser toutes nos expériences avec le souci permanent de limiter le plus possible la douleur ou l'inconfort des souris (notamment procédures d'anesthésie et d'euthanasie bien maîtrisées et antérieurement validées par le comité d'éthique, définition précise des points limites).

7032. La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative entraînant notamment d'importants troubles moteurs, et qui touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Aujourd'hui 1 Français sur 5, de 60 ans ou plus, est atteint par cette maladie chronique, qui affecte le système dopaminergique. En 2050 ce sera 1 Français sur 3. Les traitements pharmacologiques actuels permettent d'atténuer les symptômes, mais n'ont aucun effet curatif, ne permettent pas de ralentir le développement de la pathologie, entraînent des effets secondaires très gênants et leurs effets s'amenuisent au cours de l'évolution de la maladie. La stimulation cérébrale profonde, intervenant essentiellement à un stade avancé de la maladie de Parkinson, a également une action uniquement symptomatique. En conséquence, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'enrayer ou de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

De récentes études ont démontré l'effet neuroprotecteur de l'illumination proche infra-rouge (NIR) sur des cultures cellulaires ainsi que sur des modèles précliniques exposés à une neurotoxine (induisant la mort des neurones dopaminergiques et donc conduisant au développement de symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson idiopathique). Notamment, les résultats démontrent que l'illumination NIR atténue les symptômes en améliorant les performances motrices, mais préserve aussi les neurones dopaminergiques.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la persistance à long terme des effets neuroprotecteurs d'une illumination NIR, et d'établir des conditions optimales d'illumination, afin d'appuyer les résultats précliniques préalablement obtenus dans un modèle à court terme et de soutenir une application clinique imminente.

Le projet prévoit le recours à un modèle de souris avec un minimum nécessaire de 108 animaux, provenant d'élevages reconnus, afin de pouvoir étudier les comportements et les déficits moteurs qui sont les symptômes caractéristiques de la pathologie humaine. Les animaux seront exposés à une neurotoxine (afin d'induire les symptômes de la maladie de Parkinson) et traités ou non par l'illumination NIR (sur une période et des fréquences d'illumination différentes). Tout est mis en œuvre afin que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible, et pendant une durée réduite. Si les symptômes moteurs sont trop marqués, la durée d'administration de la neurotoxine pourra être réduite. Le total d'animaux nécessaire pourra être réduit de 50 % si des résultats statistiquement fiables sont obtenus avec une première moitié d'animaux.

L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe assurent le bien-être des animaux. En cas d'effets inattendus, de perte de poids importante ou d'un niveau de douleur élevé, le vétérinaire en charge du bien-être des animaux sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

7033. Le spina bifida (SB) ouvert ou myéломéningocèle (MMC) est une malformation congénitale grave liée à un défaut embryonnaire de fermeture du tube neural qui touche 1 naissance sur 1000 dans le monde. Au cours du développement, la moelle épinière embryologiquement anormale et ouverte est exposée à l'environnement intra-utérin entraînant des lésions neurologiques irréversibles. La malformation est aujourd'hui toujours détectée par échographie lors de la première moitié de la grossesse, le plus souvent au deuxième trimestre. Cette malformation peut être corrigée chirurgicalement à la naissance, mais cela ne permet pas de restaurer la fonction normale de la partie affectée de la moelle épinière. Un essai thérapeutique a montré qu'une cure chirurgicale prénatale de la malformation en deuxième moitié de grossesse, par hystérotomie, permettait d'améliorer significativement le pronostic, en limitant l'exposition de la moelle épinière à l'environnement intra-utérin. Cependant, la morbidité maternelle de cette intervention la rend difficilement acceptable. De plus, une intervention plus précoce en première moitié de grossesse pourrait permettre d'améliorer encore le pronostic d'une intervention prénatale. Afin de limiter la morbidité maternelle et de permettre une intervention précoce, nous proposons de développer et évaluer une chirurgie mini-invasive par endoscopie *in utero* dans un modèle préclinique ovin, préliminaire à un essai clinique chez l'homme.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3 R : après des essais préalables sur simulateurs, une première phase est prévue avec 3 brebis gestantes pour évaluer cette technique. Au besoin et selon les résultats, un deuxième groupe de 3 brebis gestantes est envisagé après modification de la technique. Pendant toute la durée de l'intervention les animaux sont sous anesthésie générale et analgésie et ils seront euthanasiés à la fin de la procédure.

7034. La maladie de Parkinson est une dégénérescence chronique des neurones dopaminergiques qui touche près de 6,5 millions de personnes dans le monde. Sa prévalence dans les pays occidentaux augmente avec l'âge. Les complications de la pathologie conduisent à une augmentation de la mortalité, à une baisse de la qualité de vie et son caractère chronique induit de forts coûts de santé. Les thérapeutiques actuelles, dont la stimulation cérébrale profonde, permettent d'atténuer les symptômes, principalement moteurs, mais ne permettent pas d'arrêter ou de ralentir le développement de la maladie. En conséquence, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'arrêter ou de ralentir la neurodégénérescence.

Des études ont démontré l'effet neuroprotecteur de l'illumination proche infra-rouge (NIR) sur des cultures cellulaires ainsi que sur des modèles précliniques exposés à une neurotoxine (induisant la mort des neurones dopaminergiques et donc conduisant au développement de symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson idiopathique).

L'objectif du présent projet est d'appuyer les résultats précliniques préalablement obtenus dans des modèles aigus de la maladie de Parkinson et de soutenir une application clinique imminente afin d'envisager rapidement un essai clinique.

La présence des corps de Lewy, dans les cellules dopaminergiques des malades Parkinsoniens, est soulignée comme étant un facteur pathogénique potentiel de la maladie de Parkinson idiopathique humaine. Ces corps de Lewy correspondent à des amas pathogènes formés par une protéine : l'alpha-synucléine, présentant un problème de conformation. Il apparaît donc pertinent d'évaluer les effets de l'illumination NIR sur un modèle préclinique adapté, reflétant l'agrégation de l'alpha-synucléine sous sa conformation toxique, afin de valider l'universalité de l'approche neuroprotectrice par la lumière NIR. C'est pourquoi nous souhaitons évaluer le potentiel neuroprotecteur d'une illumination NIR, sur un nouveau modèle de souris, qui devrait développer progressivement un phénotype Parkinsonien reflétant l'évolution de la maladie chez l'Homme, via l'administration intranasale (non invasive et indolore), pendant 14 jours, de la protéine alpha-synucléine sous sa conformation toxique. L'étude de l'évolution de la maladie, notamment de la dégénérescence des neurones, se fera sur 6 temps clefs (0, 15, 30, 60, 90 et 180 jours) en comparant des animaux contrôles à des animaux exposés à l'alpha-synucléine et traités ou non avec l'illumination NIR. La détermination des symptômes moteurs nécessite l'utilisation d'un modèle rongeur, avec le recours à un nombre nécessaire de 192 animaux, provenant d'élevages autorisés, afin d'assurer la validité des expériences menées. En revanche, dès que les symptômes moteurs et la neurodégénérescence sont suffisamment significatifs pour refléter la maladie humaine, l'expérience sera arrêtée pouvant ainsi réduire la durée maximale initialement prévue de 180 jours. Le nombre d'animaux pourra être réduit de moitié si les résultats statistiquement fiables sont obtenus avec la première moitié d'animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et tout est mis en œuvre afin que les animaux aient un niveau d'inconfort aussi limité que possible. En cas d'effets inattendus, perte importante de poids ou l'observation d'un niveau de douleur élevé, le vétérinaire, en

charge du bien-être des animaux, sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

7035. Les cellules souches neurales de singe représentent un modèle incontournable pour le développement de tests précliniques de thérapie cellulaire, notamment pour les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. En effet, ces cellules ont la capacité de se différencier en tous les types de cellules constituant le cerveau (neurones et cellules gliales). Cependant, l'innocuité de la greffe de cellules souches neurales dans le cerveau doit être scrupuleusement établie. Nous avons développé des biomarqueurs épigénétiques fiables très sensibles aux modifications de l'environnement permettant d'évaluer la qualité des cellules souches neurales de singe *in vitro*.

Nous projetons maintenant de valider ces biomarqueurs épigénétiques *in vivo*, après greffes de cellules souches neurales dans le cerveau de rat adulte, étape incontournable avant toute application clinique. En effet, des modifications de l'environnement des cellules greffées, comme le contexte immunitaire et inflammatoire, peuvent affecter les caractéristiques des cellules greffées (capacités de différenciation, d'intégration et de prolifération) et donc altérer leur innocuité. Ce projet de recherche fondamentale a donc pour objectif de répondre à deux questions :

Les biomarqueurs épigénétiques permettent-ils de détecter des altérations des caractéristiques des cellules greffées (capacités de différenciation, d'intégration et de prolifération) :

(1) au cours du temps après la greffe,

(2) en fonction du microenvironnement cérébral, notamment du contexte immunitaire et inflammatoire.

Nous estimons qu'un nombre total maximum de 108 rats adultes sera nécessaire pour accomplir ce projet de cinq ans. Cependant, tout sera mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés ainsi que leur stress ou souffrance. Cela sera assuré par l'optimisation du nombre d'animaux par condition expérimentale, et la conservation d'une banque de coupes de cerveaux congelées. Aucun acte ne sera mis en œuvre sur un animal présentant des signes indicatifs de douleur et/ou de gêne.

Les rats auront à leur disposition différentes formes d'enrichissement afin de réduire l'ennui et le stress. La souffrance sera contrôlée par une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude. Les animaux présentant des signes de douleur recevront une injection d'analgésique. En cas de douleur persistante malgré les traitements entrepris, l'animal sera euthanasié.

7036. L'arthrose est la maladie musculo-squelettique la plus fréquente affectant environ 40% de la population de plus de 70 ans. L'arthrose est considérée comme une pathologie à évolution lente affectant tous les tissus entourant l'articulation atteinte. Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de ralentir l'avancée de la maladie qui nécessite le recours à la chirurgie dans les cas les plus sévères.

Le vieillissement du tissu musculo-squelettique se traduit par l'altération de la réparation osseuse. En outre, l'intégration osseuse des implants est moins efficace et la régénération musculaire reste incomplète chez les patients âgés par rapport à des patients jeunes.

De même, la différenciation cellulaire en ostéoblastes *in vitro* est moins efficace à partir de culture de cellules de patients âgés que de cellules de patients jeunes.

Chez la souris, la réparation des fractures osseuses et la différenciation cellulaire en ostéoblastes sont également moins efficaces chez les animaux âgés comparés aux animaux plus jeunes. Il a également été montré que l'arthrose expérimentale était plus sévère chez la souris âgée.

Les raisons de ces différences en fonction de l'âge ne sont pas connues, des différences en concentration de facteurs circulants sanguins (protéiques ou cellulaires) sont évoquées.

Le but de ce projet est d'étudier si les facteurs présents dans la microcirculation de souris jeunes (<2mois) peuvent prévenir l'évolution de l'arthrose induite chez des souris âgées (>18mois).

Pour réaliser ce projet, nous proposons de connecter les circulations sanguines de souris jeunes et âgées et de mesurer l'impact de cette microcirculation (parabiose hétérochronique) sur la progression de l'arthrose.

Ce projet sera réalisé chez la souris car nous disposons de modèles transgéniques dépourvus de facteurs que nous souhaitons étudier. Nous utiliserons au maximum 200 souris au total dans ce projet, réparties en différents groupes.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Remplacement : l'analyse du rôle de la microcirculation sur un modèle d'arthrose ne peut se faire que sur animaux vivants. Il n'est donc pas possible de prévoir une méthode substitutive pour répondre à la question scientifique de ce projet.

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé en tenant compte des pertes éventuelles lors des interventions chirurgicales et en se basant sur l'expérience acquise au laboratoire en termes d'incidence de l'arthrose chez la souris et de mise en évidence d'effet significatif sur les paramètres histologiques mesurés en fin d'expérience.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Les interventions chirurgicales se feront sous anesthésie kétamine/xylazine et de la buprénorphine sera administrée aux animaux en post-opératoire. Des gels de nourriture hydratée seront placés dans la litière afin de faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.



7037. Ce projet porte sur l'administration répétée de complexes plasmides et de vecteurs lipidiques innovants dans le cadre de stratégies de thérapies géniques appliquées au traitement de myopathies telles que la myopathie de Duchenne. Nous voulons ici évaluer si des administrations répétées permettent de maintenir ou d'augmenter l'efficacité de transfert de gènes *in vivo* des formulations issues de nos recherches et préalablement testées de façon approfondie en conditions *in vitro*. Nos investigations nous ont permis de sélectionner des formulations représentant les candidates les plus intéressantes à tester à l'heure actuelle en termes de niveau et de la durée d'expression du gène transféré, au niveau de cellules musculaires. Au cours de ce projet 200 souris *Swiss* seront utilisées. L'imagerie de bioluminescence permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaires, en bon accord avec la règle des 3R. Pour le remplacement, tous les tests préalables sont réalisés *in vitro*. Pour le raffinement, afin de réduire le stress et la douleur chez les animaux, l'administration des complexes (plasmides-vecteurs) par méthode hydrodynamique sera faite sous anesthésie et sera suivie d'une analgésie durant 72 heures. De plus, toutes les séances d'imagerie sont réalisées sous anesthésie gazeuse.

7038. Le syndrome des ovaires polykystiques est la cause d'infertilité féminine la plus importante (10% des cas d'infertilité). Cette pathologie se caractérise par des problèmes d'ovulation, des follicules kystiques diagnostiqués par échographie et le plus souvent par un hyper-androgénisme des patientes atteintes (hirsutisme, acné). Au niveau endocrinien, elle se caractérise aussi par des modifications importantes des taux sanguins d'hormones. Principalement considérée comme une pathologie strictement ovarienne, le rôle du système nerveux central dans le syndrome des ovaires polykystiques n'a jamais vraiment été exploré. Le but de ce projet est d'étudier l'implication du système nerveux central dans ce syndrome. Cette étude sera sur le modèle ovin dont les caractéristiques de reproduction, notamment le taux d'ovulation, sont proches de celle de l'espèce humaine. L'étude des modifications structurales sera réalisée en microscopie électronique et en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Nous comparerons des brebis témoins cycliques avec des brebis présentant le syndrome d'ovaires polykystiques. Ce syndrome sera induit par une exposition des mères aux androgènes au cours de la gestation. Ce projet a été réfléchi pour respecter la règle des 3R :

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

Réduire : L'utilisation de l'imagerie *in vivo* va permettre l'observation de nombreuses structures cérébrales en même temps, sur les mêmes brebis. Cet outil, en plus d'être non invasif, va donc permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés. Deux cents animaux (150 brebis et 50 béliers) seront étudiés dans ce projet.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables, sur paille et avec du foin de qualité à volonté. Lorsque les animaux seront placés en cases individuelles, ils seront suffisamment proches et auront la possibilité de se sentir et se voir (parois en plexiglas). Ils seront placés sur une litière de paille et disposeront de foin de qualité, comme dans l'hébergement en groupe. Les manipulations des animaux se feront dans le calme.

7039. La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules pour réparer ou régénérer un organe ou un tissu endommagé par un accident, une pathologie ou le vieillissement. Ces thérapies ont bénéficié des avancées scientifiques récentes sur les cellules souches. Les cellules souches ont deux propriétés principales : l'autorenouvellement (elles se multiplient en donnant de nouvelles cellules souches) et la différenciation (selon certaines conditions de milieu et d'environnement, elles produisent des cellules spécialisées, par exemple de foie, de pancréas, de peau, de muscle, d'os etc.). Dans chaque tissu il existe des cellules souches. Nous avons choisi de travailler à partir des cellules souches mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse, et dans la gelée de cordon.

Notre projet a pour objectif de créer un greffon osseux vascularisé susceptible d'être utilisé à terme chez l'homme. Le passage à une expérimentation animale est donc nécessaire et préalable à tout essai clinique. C'est pourquoi, le but de cette étude est de tester chez la souris (*in vivo*), si l'implantation de matrices contenant des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (prédifférenciées ou non en cellules ostéoblastiques) et des cellules endothéliales (CE) permet de produire un tissu osseux vascularisé. Nous savons que ces cellules souches en culture, dans des conditions déterminées, sont capables de se transformer en cellules osseuses. De plus, il a été démontré chez la souris, la vascularisation d'une matrice cellularisée implantée en sous-cutané.

Il est important désormais de démontrer que ces matrices cellularisées implantées chez l'animal forment de l'os. Le choix du modèle animal s'est porté sur la souris *nude* qui a pour avantage d'être immunodéprimée, facile de préhension et permet surtout de comparer nos résultats avec ceux de la littérature qui utilisent la souris comme modèle.

La demande d'autorisation porte sur une durée de 2 ans avec 304 souris. Pour cette étude, nous aurons besoins de 4 à 24 souris par lot pour obtenir des tests statistiquement significatifs.

Toutes les démarches réglementaires seront entreprises pour que ces travaux soient réalisés dans de bonnes conditions pour l'animal et pour l'avancée de la recherche. Les souris bénéficieront d'un environnement adapté, d'une prise en charge de la douleur (par buprénorphine), d'une anesthésie (par Isoflurane) ainsi qu'un suivi régulier. La cage sera enrichie pour assurer le bien-être des animaux.

7040. Le syndrome de l'X fragile (FXS) représente la première cause héréditaire de déficience intellectuelle et d'autisme. Cette maladie génétique est due à l'absence du produit du gène FMR1, la protéine FMRP. Un modèle animal FXS a été développé chez la souris (Fmr1-KO) où le gène FMR1 a été inactivé. La souris Fmr1-KO récapitule une grande partie des phénotypes observés chez l'Homme (altération de la mémoire, perte d'interaction sociale, hyperactivité, macro-orchidisme et anomalie des épines dendritiques) et constitue un excellent modèle animal de la maladie. Nous avons récemment identifié dans ce modèle comment FMRP contrôle la morphologie et la fonction des épines dendritiques en régulant le niveau de lipides membranaires impliqués dans la signalisation neuronale et la stabilisation des connexions entre neurones. Nos données récentes publiées ouvrent une nouvelle perspective thérapeutique qui va être testée dans ce projet.

Nous allons tester deux approches suggérées par nos résultats : une approche pharmacologique qui utilise une molécule activatrice du mécanisme déficient identifié et une approche de thérapie génique qui utilise le gène trouvé dérégulé. L'objectif de l'étude est de montrer une preuve de principe de ces approches sur le phénotype du modèle souris. Un tel phénotype (altération de la mémoire, perte d'interaction sociale, hyperactivité, macro-orchidisme) n'est visible que chez l'animal et il n'existe pas de modèle *in vitro* de substitution.

La mutation génétique du modèle souris (Fmr1-KO) n'a pas d'impact sur le bien-être des animaux.

La molécule testée sur l'animal est approuvée par FDA aux Etats-Unis pour une autre indication thérapeutique chez l'homme et son utilisation chez la souris aux doses et durées envisagées a déjà été décrite et n'a pas d'impact visible sur le bien-être de l'animal. Cette molécule n'a cependant jamais été utilisée dans l'optique d'un traitement pour la pathologie FXS. L'étude représentera une première validation, sur le modèle souris bien établi de la maladie FXS, de l'action d'une molécule bien connue comme nouveau moyen de traitement possible avant d'envisager des essais chez l'homme.

Une étude pilote sera réalisée sur un nombre minimum d'animaux (35) pour définir le mode d'administration (orale ou intrapéritonéale) et la dose les plus appropriés pour l'étude complète. Le traitement « test » pharmacologique est administré aux souris selon le mode défini dans l'étude pilote pendant deux semaines (représentant un minimum nécessaire établi pour obtenir un effet de la molécule tout en limitant la manipulation des animaux et assurant leur bien-être ; l'effet observé sera comparé à celui d'une molécule placebo sur des groupes de souris mutantes et sur des souris sauvages avec des tests comportementaux (4 groupes de 15 animaux).

Si cette première étude est concluante, l'étude pourra être répliquée sur un deuxième lot de 4x15 souris pour atteindre une puissance statistique suffisante.

Par ailleurs, l'injection d'un système biologique de surexpression du gène identifié permettra de définir l'efficacité thérapeutique d'un système ultra-spécifique et innovant ne nécessitant qu'une injection unique. L'efficacité du procédé de thérapie génique sera abordée par une approche d'injection unique intracérébrale sous anesthésie générale. Ce procédé assure un nombre minimum d'injection contenant la plus petite quantité de matériel pour des résultats les plus efficaces, de la même façon que ce qui est effectué sur des patients atteints d'autres pathologies. Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude.

Afin de satisfaire à la règle de réduction du nombre d'animaux, comme pour l'étude pharmacologique, une étude pilote sur un nombre limité de 18 souris permettra de valider l'approche avant d'entreprendre l'étude complète sur 4 groupes de 15 animaux et une réplification sur un deuxième lot d'animaux.

Un total de 293 animaux sera utilisé pour l'intégralité du projet (incluant une duplication complète des expériences si les premières sont concluantes).

Enfin, afin de raffiner nos procédures et réduire au minimum tout stress ou douleur, les animaux seront pesés de façon hebdomadaire et euthanasiés en cas d'atteinte des points limites (comme une perte de poids importante) ou s'ils présentent des signes de douleur.

7041. L'expansion des hémisphères cérébraux (néocortex) est la clé de voûte de l'évolution des fonctions cognitives chez les mammifères. De nombreuses pathologies peuvent affecter ce développement optimum. Parmi celles-ci, les microcéphalies affectent 2-3% de la population mondiale et découlent souvent de l'exposition de l'embryon à des conditions de grossesse défavorables. Il existe cependant des formes congénitales (MCPH) extrêmement rares mais qui représentent des outils de choix pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les patients MCPH sont porteurs de mutations dans l'un des 12 gènes (MCPH1-12) responsables de la maladie et présentent principalement une petite tête et un déficit intellectuel.

Ces pathologies sont désormais diagnostiquées de plus en plus tôt, mais il n'existe à ce jour aucune approche thérapeutique. En utilisant les souris déficientes en neuropeptide VIP (Peptide Vasoactive Intestinal), qui ont un cerveau de petite taille et peu de protéines MCPH1, nous avons l'occasion unique d'étudier les interactions étroites entre les facteurs environnementaux extrinsèques et la production maternelle de VIP pendant la période cruciale du développement des fonctions corticales. Cette approche, qui ne peut être réalisée qu'*in vivo*, devrait permettre de déterminer de façon précise l'incidence respective de différents stress sur la formation du cerveau. Les résultats de cette étude devraient permettre de 1-améliorer notre compréhension des facteurs responsables de l'apparition de microcéphalie et des déficits intellectuels et ainsi 2- proposer des stratégies de protection. Ce projet utilisera un maximum de 2000 femelles et 5000 descendants de tout sexe sur 5 ans.

Le nombre de souris a été calculé au plus juste selon la règle des 3Rs. Ainsi les animaux témoins seront utilisés dans plusieurs séries d'expériences pour en limiter le nombre. Le projet repose essentiellement sur l'utilisation de souris femelles dans des accouplements datés (constatés par la recherche indolore du bouchon vaginal) pour générer des

embryons, des fœtus et de jeunes souris et étudier la croissance de leurs cerveaux et leurs capacités intellectuelles. Par ailleurs l'ordre des expériences a été affiné et les cages de reproduction seront gérées avec soin pour ne collecter que les échantillons nécessaires à la constitution des groupes expérimentaux sans générer des reproductions inutiles. Enfin certains résultats *in vivo* (obtenus sur les stades embryonnaires précoces) seront confirmés à partir de culture de cellules souches neurales réalisées en routine au laboratoire afin de remplacer au maximum les expériences *in vivo* par des tests *in vitro*.

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettent la réalisation des procédures expérimentales dans des conditions optimales.

7042. Le pseudomyxome péritonéal ou maladie gélatineuse du péritoine est un cancer rare du péritoine. Cette tumeur touche

2 cas par million d'habitant et par année et elle est dans 95% des cas d'origine appendiculaire. Elle est caractérisée par une distension abdominale et la maladie est souvent étendue, voire très étendue à l'ensemble de la cavité abdominale. Le diagnostic est souvent porté tardivement.

L'exérèse complète par chirurgie de cytoréduction suivie d'une CHIP (Chimio-Hyperthermie IntraPéritonéale) donne de bons résultats en termes de survie, dans les formes de bas grade, comme dans les formes de haut grade et doit être considérée comme le traitement de référence. Cependant, ce traitement lourd ne peut être proposé qu'à des patients en excellent état général du fait du risque de mortalité post-opératoire. C'est pourquoi, le but de cette expérience est de tester l'effet d'anti-angiogéniques ou d'autres traitements comme des anti-inflammatoires sur l'évolution du pseudomyxome et de ce fait pouvoir déterminer un traitement pour les patients qui ne peuvent supporter une chirurgie lourde. Nous désirons étendre ce projet au mésothéliome, une forme encore plus rare de cancer du péritoine qui prend son origine dans les cellules même du péritoine et qui est souvent provoqué par l'amiante. Cette tumeur est très peu cellulaire car essentiellement formée de gélatine, nous ne pouvons l'étudier *in vitro*. Il est nécessaire de reproduire la maladie par un modèle de greffe orthotopique par greffe de fragment de pseudomyxome en intrapéritonéal sur des souris *nude*. A chaque expérience, lorsque c'est possible, nous utiliserons un groupe contrôle pour 3 groupes testés, le troisième groupe testé correspondant à l'association entre 2 médicaments. Cela permettra de diminuer le nombre d'animaux. Les points limites sont les suivants : perte de poids >20%, isolement, yeux fermés, dos voûté, déshydratation, automutilation. Ces points seront surveillés deux fois par semaine par l'expérimentateur et de façon journalière par l'animalier pour permettre de limiter la douleur de l'animal à son minimum. Aussi, afin de limiter la souffrance des animaux, ils auront une injection d'analgésique en préopératoire qui sera renouvelée toutes les 24 heures pendant les 48 heures post-opératoires. Les animaux seront suivis par des techniques d'imagerie déterminées au préalable : IRM associée au scanner de perfusion ou à l'échographie de contraste et au doppler. Pendant la durée du projet, nous envisageons d'utiliser 954 souris *Nude*.

Par ailleurs, cette expérience permettra la création d'un modèle pour tester les anti-angiogéniques car leur effet sera interprété sans biais du fait de la faible croissance tumorale. En effet les modèles tumoraux sur les animaux sont des tumeurs qui utilisent les facteurs proangiogéniques comme des facteurs de croissance. Dans le cas du pseudomyxome le faible nombre de cellules devrait limiter ce biais et tester un effet anti-angiogénique presque pur, comme celui testant une molécule *via* le matrigel implanté dans le flanc d'une souris (modèle classique). Ce modèle a donc un intérêt pour les patients porteurs de pseudomyxome (nouveau traitement) et pour la population générale porteuse d'un cancer de toute origine (nouveau modèle pour tester un anti-angiogénique).

7043. Un patient présentant une altération sévère de contractilité devant subir une intervention chirurgicale cardiaque, nécessite un arrêt cardioplégique sous circulation extracorporelle (CEC). Cet arrêt cardioplégique permet d'interrompre l'activité mécanique du cœur et la mise au repos de ce dernier durant le geste chirurgical cardiaque. En effet, l'interruption de l'activité mécanique cardiaque permet de diminuer les besoins métaboliques du myocarde et préserve ainsi ses réserves énergétiques. Néanmoins, l'arrêt cardioplégique induit une modification profonde des cycles métaboliques du myocarde et aboutit potentiellement à un certain degré d'ischémie (privation d'oxygène) et expose le myocarde à des lésions d'ischémie-reperfusion particulièrement délétères sur un myocarde ischémique et altéré sur le plan contractile.

C'est la raison pour laquelle ont été développées des techniques permettant de réaliser, sur un cœur non travaillant et déchargé (sous CEC), des gestes valvulaires à cœur battant avec perfusion du réseau coronaire en sang oxygéné. Ces techniques font appel à une perfusion coronaire antérograde ou rétrograde par le sinus coronaire. Il a été ainsi démontré que la perfusion rétrograde en sang oxygéné par le sinus coronaire permettait de réaliser des chirurgies valvulaires dans de bonnes conditions et avec des résultats intéressants. Ces techniques particulières s'inspirent directement de la possibilité de perfuser le myocarde *via* le sinus coronaire de façon rétrograde. Nous avons, lors d'un travail précédent, démontré la faisabilité de maintenir une activité mécanique cardiaque sur un cœur explanté et non travaillant par l'intermédiaire d'une perfusion antérograde.

Il nous est apparu essentiel de vérifier si la perfusion rétrograde, via le sinus coronaire, permettait, sur un cœur travaillant, de pallier totalement ou partiellement aux conséquences délétères d'une occlusion artérielle coronaire en diminuant les lésions tissulaires ischémiques, voire en évitant l'apparition d'une nécrose myocardique.

Nous posons l'hypothèse que le principe d'une perfusion rétrograde en sang oxygéné pourrait permettre, en situation clinique, de limiter voire d'éviter la survenue d'un infarctus du myocarde après occlusion aiguë d'une artère coronaire, dans le territoire situé en aval de l'artère occluse.

Le modèle animal porcin est classiquement utilisé en raison de ses similitudes anatomiques et hémodynamiques avec le cœur humain.

Ce projet utilisera 22 cochons (poids entre 40 et 60 kg). Sous anesthésie générale, l'animal sera placé en CEC par cathétérisme de l'aorte ascendante et relié directement, via une tubulure, à un cathéter de perfusion rétrograde positionné dans le sinus coronaire, après ligature de la veine azygos gauche. L'artère interventriculaire antérieure (IVA) sera occluse de façon à créer une ischémie myocardique sur la face antérieure du ventricule gauche en respectant l'intégrité de la grande veine coronaire. Les paramètres hémodynamiques (débit cardiaque, fréquence cardiaque, pression artérielle...) seront enregistrés en continu pendant 4 heures. A la fin de la procédure, les animaux seront euthanasiés pour prélever le cœur et poursuivre les investigations au niveau anatomo-pathologique pour rechercher les lésions de nécrose constituée et en déduire la qualité de la rétroperfusion et ses capacités à éviter un infarctus ou à réduire la taille de l'infarctus.

Nous avons établi des points limites qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie contrôlée, anesthésie chirurgicale).

Ce modèle est déjà en place dans notre structure permettant de réduire le nombre d'animaux. Ainsi, 22 animaux sont nécessaires (comprenant une mortalité prématurée maximale de 30%) pour une étude statistiquement exploitable.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (établissement des points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée), qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique, permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

7044. Notre plateforme IRM réalise une palette de prestations de service très large, allant de la mise à disposition des équipements IRM à la réalisation, par la plateforme, d'expériences IRM selon les besoins du demandeur. Dans ce contexte, la plateforme est amenée à accueillir temporairement, à la journée, des animaux extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend. Ces animaux sont déjà inclus dans une autorisation de projet rattaché à l'établissement utilisateur concepteur dont dépend le demandeur de la prestation de service. Ils entrent sur la plateforme IRM préclinique pour subir un protocole d'imagerie puis repartent dans leur établissement d'origine ou sont euthanasiés sur place en accord avec le protocole expérimental. Les objectifs de l'imagerie sont (i) la mise en évidence de lésions ou anomalies dans des modèles animaux de pathologies et l'identification de leurs caractéristiques physiologiques (métabolisme, perfusion, présence d'œdème, ...), (ii) le suivi de l'évolution de ces lésions et de leurs caractéristiques au cours du temps après traitement. Cette demande a pour objectif d'autoriser uniquement les protocoles d'imagerie mis en œuvre sur la plateforme pour le compte des responsables de projet extérieurs à l'établissement utilisateur dont elle dépend. La plateforme s'engage à vérifier que les projets qu'elle accueille ont reçu un avis favorable de la part du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche avant toute expérimentation dans ses locaux. Les projets accueillis sur la plateforme concernent l'étude de pathologies et leur suivi thérapeutique ou des simulations informatiques (contextes innovants qui nécessitent des expériences pour alimenter les futures simulations). Il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire car il y a nécessité de prendre en compte (i) les interactions des cellules malades avec les autres cellules de l'organe voire des autres organes, qui peuvent modifier le comportement et les réponses des cellules malades, et (ii) les modifications possibles du médicament dans l'organisme avant d'atteindre la cellule ciblée. Cette demande d'autorisation est formulée pour un quota de 100 porcs sur une durée de 5 ans. Un décompte des animaux extérieurs imagés sera tenu et une nouvelle demande sera déposée si le quota est dépassé avant la fin de la période de 5 ans. Il faut savoir que l'imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés car elle permet (i) de visualiser de façon non traumatique des lésions internes de l'animal, non visibles autrement, (ii) de constituer des groupes avec des lésions homogènes (en terme de taille ou caractéristique), (iii) de suivre les mêmes animaux au cours d'un traitement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur par rapport aux points limites définis pour les procédures expérimentales mises en œuvre. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

7045. Avec l'augmentation de l'espérance de vie, la population est de plus en plus sujette à des déficits mnésiques, au cours du vieillissement normal ou pathologique (Maladie d'Alzheimer, MA). C'est pourquoi il est urgent de développer des traitements qui pourraient cibler directement les processus moléculaires sous-jacents aux symptômes cognitifs. Les modifications épigénétiques, et notamment les modifications post-traductionnelles (MPT) des histones tel que l'acétylation, jouent un rôle primordial dans la formation de la mémoire. La régulation de ces modifications est sensible aux changements au cours de la vie, comme l'expérience, le vieillissement ou encore certaines situations pathologiques. Par exemple, certaines modifications d'histones ou d'enzymes les régulant sont altérés dans des zones clés de la mémoire, dans le cerveau de souris modèles Alzheimer, ainsi que chez les patients. En modulant ces enzymes avec de nouvelles molécules, nous développons des stratégies innovantes visant à améliorer les processus de mémoire. Ces composés pourraient réactiver directement les programmes génétiques déficients dans les neurones, dans l'espoir de restaurer la plasticité synaptique malgré l'établissement des mécanismes neurodégénératifs.

Ce projet vise à comprendre les mécanismes de régulation des programmes génétiques par les modifications post-traductionnelles des histones dans un modèle murin de tauopathie en relation avec 1/ l'âge des souris, 2/ leurs déficits mnésiques et 3/ les structures cérébrales affectées par la pathologie.

Règle des 3R. Remplacement : L'évaluation des performances de mémoire ne peut se faire que chez un animal dans un test comportemental. A ce jour, les modèles *in vitro* ne peuvent pas rendre compte de la complexité des fonctions impliquées dans les performances cognitives d'un individu. Les analyses moléculaires ne sont possibles qu'à partir de tissu cérébral prélevés au cours de la cinétique du processus mnésique. Réduction : Le nombre total de souris (172), a été réduit au minimum pour permettre des analyses statistiques fiables sur les souris car il existe une dispersion des performances de mémoire et des signalisations moléculaires chez les animaux pathologiques. Raffinement : afin de minimiser l'anxiété, la douleur et la souffrance, les animaux sont manipulés 2 min/jour, durant la semaine précédant le début du test comportemental. Les injections sont réalisées avec des volumes faibles et des petites seringues adaptées à la Souris. Ces manipulations permettent de réduire le stress ou la peur que l'animal pourrait ressentir devant une situation nouvelle et qui fausserait les paramètres d'évaluation de la mémoire. Ainsi, les animaux seront plus coopératifs à la réalisation de la tâche, nous permettant une interprétation correcte de leurs performances d'apprentissage et de mémoire et donc une optimisation du nombre d'animaux.

7046. Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme et la seconde cause de mortalité masculine par cancer dans les pays industrialisés. Les principaux traitements sont la chirurgie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Cette dernière a pour but d'empêcher l'action stimulante de la testostérone sur les cellules cancéreuses. Un premier moyen d'empêcher l'action de la testostérone est de bloquer sa synthèse par les testicules. Un second moyen d'action est d'inhiber de manière compétitive la fixation de la testostérone à son récepteur par des anti-androgènes. Cependant, 10 à 20 % des patients traités par hormonothérapie développeront un cancer prostatique résistant à la castration. De plus, des études récentes ont montré un effet bénéfique de la vitamine D chez les patients atteints du cancer de la prostate. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans ces phénomènes permettrait le développement de marqueurs prédictifs de réponse au traitement et d'éventuelles alternatives thérapeutiques.

REMPACEMENT : une stratégie de choix pour l'étude de ces mécanismes est l'utilisation de modèles murins de cancer de la prostate, subissant un traitement à la vitamine D ou une ablation des testicules. L'utilisation de modèles animaux est nécessaire pour mimer le plus fidèlement possible la maladie humaine et observer les effets sur l'organisme entier.

REDUCTION : de nombreuses études menées auparavant sur le cancer de la prostate et sur ces modèles en particulier, ont mené à une bonne connaissance du modèle et de la méthodologie appropriée, permettant ainsi la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées sur un nombre limité de cohortes, et la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. Ce projet sur cinq ans requiert un nombre total de 580 animaux.

RAFFINEMENT : si certaines expériences (castration ou administration de vitamine D) ont des conséquences sur le bien-être de l'animal, des mesures seront prises (utilisation d'analgésique, complémentation de l'eau de boisson en sel, suivi du réveil et des points de suture après anesthésie...) pour éviter la souffrance de l'animal.

7047. L'ataxie de Friedreich est une maladie génétique rare (incidence 1/50000) qui touche aussi bien les garçons que les filles et où prédominent essentiellement des signes neurologiques (trouble de l'équilibre, difficultés à coordonner ses mouvements, difficultés à s'exprimer, perte des réflexes) et des troubles viscéraux (cardiomyopathie obstructive et diabète sucré). La cause du décès est souvent cardiaque mais elle peut également survenir suite à un étouffement. Il survient à un âge très variable. Cette maladie est caractérisée par des lésions de la moelle épinière et du cervelet (dégénérescence spinocérébelleuse). A l'heure actuelle il n'y a pas de traitement curatif, cependant l'Idébénone est préconisé chez les patients à la dose de 5 à 7.5 mg/kg/jour. L'ataxie de Friedreich, la plus fréquente des ataxies héréditaires d'origine génétique, se déclare généralement à l'adolescence. Le gène muté est le gène de la Frataxine qui est une protéine de la matrice mitochondriale. L'atteinte neurologique domine le pronostic de cette maladie et ne bénéficie pas encore d'une prise en charge efficace et reste sans traitement. Aussi, un traitement par thérapie génique pour apporter une copie normale du gène codant pour la frataxine serait donc une approche pertinente, si on arrivait à cibler le transfert de gène dans certaines parties du système nerveux (le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière).

L'approche par Thérapie Génique a récemment montré cette pertinence dans l'atteinte cardiaque de cette maladie. La compétition internationale est sévère (au moins 3 groupes avec approches semblables) et les différences de stratégie reposent sur le choix des vecteurs et sur la voie d'administration que le modèle animal macaque permet au mieux d'appréhender. Toutefois l'étude proposée ici reste unique.

Le projet porte sur 10 primates afin de déterminer l'efficacité d'un vecteur AAV2i8-FXN-HA après administration unique par voie intra-cérébro-ventriculaire, infusion intrathécale, intracisternale et intraveineuse. Le but étant de déterminer la voie la plus efficace afin de cibler de façon prédominante le cervelet.

L'objectif de ce projet est de déterminer la bio-distribution, l'efficacité de la transduction, la réponse immune et la sécurité de l'AAV2i8-FXN-HA après administration concomitante dans le système nerveux central (SNC) et par voie intracoronarienne (IC) afin de cibler à la fois le SNC et le cœur.

La voie d'administration dans le SNC retenue sera celle déterminée comme étant la plus efficace dans l'étude pilote précitée en cours. Suivra 48 h après l'administration IC.

1- Remplacement

Cette étude aura lieu chez le *Macaca fascicularis* dont le cerveau est de structure proche de l'humain. Afin d'estimer l'efficacité de notre approche expérimentale, il est nécessaire d'administrer les vecteurs chez un animal possédant une structure cérébrale proche de celle de l'homme afin de pouvoir évaluer la bio-distribution de ceux-ci et d'extrapoler les résultats à l'homme. Ceci ne peut être obtenu *in vitro* et justifie notre recours à des animaux.

## 2- Réduction :

14 macaques seront inclus dans l'étude (6 mâles et 8 femelles), répartis en 7 groupes différents en fonction des doses du vecteur thérapeutique, un groupe contrôle et un groupe pilote intra-coronarienne :

groupe 0 : groupe pilote intra-coronarienne avec produit de contraste

groupe 1, groupe contrôle : tampon de formulation en SNC et IC

groupe 2 : 2E13 vg en SNC et 1E13 vg en IC

groupe 3 : 2E13 vg en SNC et 1E12 vg en IC

groupe 4 : 2E12 vg en SNC et 1E13 vg en IC

groupe 5 : 2E12 vg en SNC et 1E12 vg en IC

groupe 6 : 5E12 vg en SNC et 5E12 vg en IC

Les groupes sont composés de 2 animaux, 1 mâle et une femelle. Seul le groupe pilote (injection de produit de contraste intra-coronarienne) inclus 2 femelles. Compte tenu de l'expertise de l'équipe vétérinaire en place, de celle de l'investigateur principal (neuropathologiste), du neurochirurgien et cardiologue intervenant, la robustesse des résultats avec le nombre d'animaux réduit par groupe sera suffisante pour en tirer les informations recherchées. Il n'est donc pas prévu d'analyse statistique.

Les 12 animaux de cette étude seront suivis durant 3 mois post injections avant euthanasie. Les 2 animaux du groupe pilote seront réutilisés ultérieurement dans une prochaine étude.

## 3- Raffinement :

Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place. Ils ont été optimisés grâce à notre expertise de l'espèce macaque.

- IRM, administrations en SNC et IC : anesthésie fixe avec relai gazeux.

- Prélèvements sanguins : anesthésie fixe

Les voies d'administration dans le SNC les plus susceptibles d'être les plus efficaces sont l'intra-cérébro-ventriculaire (ICV) et l'intrathécale (IT).

- Des protocoles d'analgésie seront mis en place pour la voie ICV : association de morphine avant incision cutanée et d'un anti inflammatoire. Au niveau du site opératoire (craniotomie) une crème anesthésique sera appliquée avant le réveil de l'animal.

Pour la voie intrathécale, un anti-inflammatoire sera administré à la fin du temps opératoire, ainsi qu'au niveau du site de ponction lombaire.

La voie intra-coronarienne sera pratiquée 48 h après l'injection intracérébrale en fonction de l'état général de l'animal.

L'injection sera réalisée par un cardiologue expérimenté, habitué à pratiquer des coronarographies chez les nouveau-nés dans le cas de suspicion de malformations cardiaques. Il a également effectué ces injections sur le porc. Enfin le Centre est déjà en possession d'équipements d'imagerie permettant la mise en place d'un cathéter dans le tronc commun naissant du sinus aortique.

Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupe de 2 ou 3 quand possible (hors période de suivi postopératoire par exemple).

Les animaux seront surveillés quotidiennement par les animaliers et un vétérinaire, et une liste des points limites sera disponible. Un programme d'enrichissement regroupant plusieurs activités est en place.

7048. Actuellement, on compte plus de 350 millions de personnes diagnostiquées pour un diabète de type 2 dans le monde. A cause de notre mode de vie (sédentarité, régime alimentaire riche en graisses et en sucre), les cas déclarés de cette maladie sont en forte augmentation : les épidémiologistes prévoient plus de 550 millions de cas recensés en 2030. Ainsi, soigner cette pathologie représente un enjeu de santé publique majeur. L'un des premiers symptômes de cette pathologie est une glycémie (concentration de glucose dans le sang) très élevée, qui engendre des conséquences délétères dans tout l'organisme. Il convient donc de réguler et stabiliser cette glycémie à un taux physiologique. Dans cette perspective, nous avons récemment démontré une nouvelle stratégie thérapeutique qui consiste à ralentir la motricité de l'intestin, *via* le système nerveux qui lui est propre, pour limiter l'absorption du glucose et son passage dans la circulation sanguine mais également pour améliorer son utilisation par les muscles. Notre objectif actuel est donc d'identifier une ou plusieurs molécules, par des approches pharmacologiques ou nutritionnelles, capables de ralentir des contractions intestinales, sans effets délétères pour l'organisme.

Avant de tester ces différents composés en recherche clinique chez l'Homme, nous devons valider leurs effets chez l'animal. Ainsi, le recours à un modèle de souris rendue obèse/diabétique suite à un régime hyperlipidique prolongé, est indispensable pour nos recherches, modèle mimant parfaitement la pathologie chez l'Homme. Les effets observés dans les différentes procédures expérimentales devront être comparés à ceux observés chez des souris nourries avec un régime standardisé. Afin de répondre à cet objectif, le nombre d'animaux utilisés sera de 4000 souris en raison de 800 animaux par procédures (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester sur une durée de 5 ans. Cet effectif nous permettra de tester 20 conditions expérimentales distinctes (nature de la molécule, dose de traitement...). Un contrôle quotidien sera réalisé afin

de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements. Dans le cas, où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée (les observations s'effectuant le matin) et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait euthanasié.

7049. L'ataxie autosomique récessive cérébelleuse 2 (ARCA2) est un syndrome héréditaire rare qui se caractérise par une ataxie cérébelleuse progressive débutant dans l'enfance, parfois associée à une intolérance à l'exercice avec élévation modérée des lactates, un déficit intellectuel léger, ou des crises épileptiques. Le syndrome est dû à des mutations du gène ADCK3, un gène qui semble avoir un rôle dans la biosynthèse de l'ubiquinone (Coenzyme Q10). A ce jour, nous ne connaissons pas les voies physiopathologiques impliquées dans cette maladie, ce qui prévient de comprendre l'hétérogénéité des symptômes chez les patients. Par ailleurs, aucune approche thérapeutique n'est disponible pour ARCA2.

Nous avons généré dans le laboratoire un modèle murin de la pathologie par délétion constitutive d'ADCK3. Ce modèle reproduit plusieurs symptômes avec des phénotypes modérés et lentement progressifs, se développant entre 5 et 40 semaines. Par ailleurs, des données biochimiques suggèrent un défaut métabolique et un déficit en coenzyme Q dans divers organes. Ces souris constituent donc un bon modèle pour comprendre la physiopathologie de la maladie et pour tester des approches thérapeutiques.

L'objectif de notre projet est de continuer la caractérisation approfondie du phénotype cérébelleux afin d'identifier les voies impliquées. Pour ce faire, nous allons générer un modèle conditionnel avec délétion uniquement dans les cellules de Purkinje du cervelet afin de déterminer leur implication dans les différents phénotypes comportementaux que nous avons déjà observé dans le modèle constitutif. En effet, seules les cellules de Purkinje ont été identifiées comme atteintes lors de nos analyses histologiques au cours des dernières années. La génération de ce modèle nous permettra de déterminer si seules les cellules de Purkinje sont responsables de l'atteinte cérébelleuse, ce qui permettrait de connaître les cellules à cibler pour des approches thérapeutiques à long terme. En parallèle de ces études chez l'animal, nous utiliserons aussi des cultures primaires de cervelet afin d'étudier dans un système plus simple les voies physiopathologiques.

REMPACEMENT : L'utilisation de cultures cellulaires primaires permet en partie de réduire le nombre d'animaux mais surtout cela permet de réduire les procédures effectuées sur l'animal.

REDUCTION : Pour ce faire, nous aurons besoin d'un total de 360 souris : 180 souris sauvages et 180 souris mutantes qui serviront pour les analyses de comportement, la mise en culture et toutes les analyses histologiques, biochimiques et moléculaires. Ceci correspond au nombre minimum requis pour avoir des résultats statistiquement significatifs dans nos différents tests.

RAFFINEMENT : pour toute procédure expérimentale pouvant induire une quelconque souffrance animale, une analgésie sera utilisée. Une attention particulière sera portée aux animaux développant une ataxie avec notamment la mise à disposition de nourriture gélifiée dans la cage.

Le but ultime du projet est de comprendre la physiopathologie associée à un déficit en ADCK3 afin de trouver une thérapie efficace pour les patients ARCA2. Cela permettrait d'améliorer la vie des patients et si possible de stopper ou au moins ralentir la progression de la maladie.

7050. Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales qui ont acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme et prolifèrent indéfiniment pour former une tumeur maligne et/ou des métastases.

Les facteurs de risque sont multiples (environnementaux, génétiques, hormonaux) et provoquent la mutation d'une ou plusieurs protéines conférant à la cellule un caractère malin.

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

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests *in vitro* sont d'abord systématiquement effectués sur des cellules humaines en culture, mimant artificiellement la pathologie de l'homme. Grâce à ces tests *in vitro*, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles *in vivo* de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. C'est en effet dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anticancéreuse.

Pour pouvoir effectuer ces évaluations *in vivo*, il est indispensable de se placer à des doses pharmacologiques suffisantes mais n'induisant pas de toxicité sur l'organisme. Il est donc nécessaire de connaître préalablement à ces évaluations, la dose dite « de travail » qui devra être utilisée par la suite pour un composé à tester.

L'objet de ce projet consiste donc à déterminer les doses de travail à utiliser dans les études de pharmacologie pour évaluer l'activité et l'efficacité de candidats médicaments dans des modèles de tumeurs greffées chez des souris.

Le principe va consister à administrer à des souris non greffées, différentes doses de composé selon plusieurs schémas de traitement. Les doses auront été déterminées au préalable généralement sur la base de connaissances sur la structure chimique, à partir de la littérature ou encore l'expertise scientifique.

Suite à ces administrations, les souris font l'objet d'une surveillance spécifique pour toute la durée de l'étude, l'état général, *via* un relevé des signes cliniques régulier et précis et le poids corporel. Dans certains cas les bilans sanguins relevés au cours de l'étude, pendant et après traitement, permettront de déterminer cette dose de travail. Si une administration (produit/voie/dose) induit un signe clinique défini comme un critère d'interruption (point limite), l'animal est automatiquement euthanasié pour limiter sa souffrance. C'est la dose la plus élevée (DMT- Dose Maximale Tolérée), l'animal pour laquelle il n'y a pas eu ou il y a eu uniquement des signes cliniques mineurs, qui est alors retenue pour les études pharmacologiques. Si par contre aucune des doses testées ne génère de signe clinique, alors la plus haute dose testée devient la dose de travail et est identifiée comme la DMA (Dose Maximale Administrable).

Afin que les souris se trouvent dans les meilleures conditions d'hébergement, elles sont logées par groupes sociaux, en présence de coton pour favoriser leur instinct de nidification. De plus, leur comportement vis-à-vis de ce coton servira d'élément d'évaluation de leur état général.

Chaque dose de produit sera généralement testée sur un petit nombre d'animaux, suffisant pour permettre de déterminer la dose de travail et d'attribuer clairement les signes cliniques au produit. Compte tenu du nombre de produits pouvant être étudiés, on estime à 375 le nombre de souris nécessaire sur les 5 années du projet.

7051. L'apnée du sommeil est une pathologie fréquente dont l'incidence augmente avec l'âge. Chez le sujet jeune, il est clairement démontré que l'apnée du sommeil est un authentique facteur de risque cardiovasculaire. L'atteinte microcirculatoire pourrait être un des premiers signes d'un futur événement cardiovasculaire à venir. Chez le sujet âgé, l'effet délétère de l'apnée du sommeil est moins marqué et les conclusions des études menées divergent.

Depuis quelques années, des modèles animaux d'apnée du sommeil ont été développés sous la forme de modèle murin exposé à l'hypoxie intermittente et ont permis d'approfondir les connaissances dans ce domaine. Cependant des différences observées entre les sujets jeunes et âgés restent à élucider, en particulier concernant le rôle de la vascularisation.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet de l'hypoxie intermittente en fonction de l'âge sur la microcirculation cutanée. Pour cela nous proposons de quantifier l'atteinte sur la microcirculation cutanée, induite par une exposition à l'hypoxie intermittente, chez des souris jeunes et âgées et d'observer la récupération potentielle de celle-ci après arrêt de l'exposition à l'hypoxie (normalisation). Les paramètres microcirculatoires étant facilement accessibles chez l'homme, ce type d'exploration permettrait d'identifier les sujets les plus à risque dans la population âgée nécessitant un traitement et d'évaluer l'efficacité du traitement sur le long terme.

Notre projet inclut la règle des 3R.

La réactivité vasculaire repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Ce projet concernera 1218 souris au maximum. Les souris seront suivies avec un soin particulier avec des points limites clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

7052. Dans toutes les cellules eucaryotes, l'expression des gènes doit être adaptée à l'environnement cellulaire, c'est à dire à l'ensemble des signaux intra- et extracellulaires qui sont autant d'informations à intégrer pour une réponse adéquate. Ces voies de signalisation sont principalement étudiées grâce à des cellules en culture. Pour transposer les résultats obtenus dans ce système modèle à l'homme, organisme multicellulaire complexe, il est nécessaire de les étudier également dans un organisme complexe pouvant répondre à des stimuli plus élaborés tels que la réponse au stress, à un environnement inconnu, etc. De par sa petite taille, ses nombreuses ressemblances génétiques avec l'Homme, et les facilités de modification de son génome, la souris est un excellent modèle pour étudier et comprendre ces mécanismes. Face à un stimulus, un organisme activera très rapidement l'expression de certains gènes appelés gènes à réponse rapide ou "immediate early genes". Leur expression permettra d'activer en cascade l'expression d'autres gènes qui permettront à la cellule/l'organisme de fournir une réponse appropriée au stimulus. Pour pouvoir étudier *in vivo* facilement l'expression d'un gène, il est d'usage d'utiliser des protéines fluorescentes. Il est néanmoins nécessaire de démontrer que cette molécule reportrice est bien exprimée dans les mêmes conditions que le gène seul. Si c'est le cas, ces lignées peuvent être utilisées pour étudier *in vivo* l'expression du gène cible.

Dans le cadre d'une autre autorisation de projet et grâce à un financement du grand emprunt, nous avons généré quatre lignées de souris où l'un de ces gènes à réponse rapide est couplé à une protéine fluorescente.

Remplacement : En utilisant des techniques classiques de biologie moléculaire, nous avons déjà contrôlé *in vitro* que cette modification a bien été intégrée dans le génome et qu'elle est exprimée dans le cerveau des souris. Nous souhaitons maintenant valider que ces lignées sont des reportrices de l'expression de ce gène suite à un stimulus dans un organisme vivant.

Réduction : Basé sur la littérature, ce gène est exprimé face à de nombreux stimuli dont le stress, par exemple pour un rongeur le stress d'une nage forcée de 10 minutes. La nage forcée résultant en une forte expression de ce gène, le résultat attendu devrait être important, permettant ainsi de travailler avec peu de souris par groupe expérimental. Jusqu'à 48 animaux au total seront utilisés pour valider/invalider les 4 lignées. Nous souhaitons donc soumettre nos souris transgéniques à de la nage forcée.



Raffinement : Afin d'éviter tout risque de noyade :

° Les souris incluses dans le test seront des souris adultes et n'auront aucun souci locomoteur.

° L'expérimentateur surveillera les souris pendant tout le temps de la baignade et repêchera toute souris montrant des signes de fatigue.

° La température de l'eau sera d'environ 25°C pour empêcher toute hypothermie.

Dans un souci de bien-être animal, à l'issue du test, les souris seront séchées ce qui leur permettra de retrouver rapidement une température corporelle adéquate. Au maximum une heure après la fin de la nage forcée, les souris seront euthanasiées et leur cerveau sera analysé.

7053. Les lésions du nerf sciatique représentent la méthode classique pour étudier la régénérescence axonale des neurones. Dans notre laboratoire, nous travaillons sur une maladie neurodégénérative, l'ataxie de Friedreich (AF). Les patients développent une perte de coordination progressive consécutive à la perte de neurones au niveau des ganglions dorso-rachidiens (DRG). Il existe un modèle de souris pour cette pathologie humaine qui reproduit les phénotypes neurologiques développés chez les patients AF, entre autre une dégénérescence des fibres sensibles.

L'un des objectifs de nos recherches est de comprendre la physiopathologie de la neuropathie et notamment les mécanismes moléculaires et cellulaires ayant lieu au niveau des DRG et du nerf sciatique. Les mécanismes moléculaires se mettant en place lors d'une lésion du nerf sciatique sont bien documentés, ainsi nous voudrions vérifier si les mêmes mécanismes se mettent en place dans nos souris au fur et à mesure de la progression de la pathologie, mais aussi de la régénérescence axonale des neurones lorsque nous traitons des souris malades grâce à la thérapie génique.

Ainsi nous avons besoin d'utiliser des souris de laboratoire ayant ou non subi une lésion bilatérale du nerf sciatique afin de les comparer à nos souris modèles de l'Ataxie de Friedreich.

Un total de 80 souris sauvages sera utilisé pour ce projet, 40 souris subiront une lésion bilatérale du nerf sciatique, et les 40 autres auront la procédure chirurgicale mais sans lésion afin d'être utilisées comme contrôles. Une fois les lésions réalisées les souris seront analysées à différents temps post opératoires.

Remplacement : L'objectif de ce projet étant d'étudier la réponse à une lésion du nerf sciatique *in vivo*, c'est-à-dire dans l'organisme entier vivant ; il n'est pas possible d'utiliser une autre approche expérimentale.

Réduction : Pour chaque groupe expérimental, nous utiliserons 10 souris, correspondant au minimum requis pour une analyse statistique puissante. Ce nombre est aussi justifié pour nous permettre de travailler sur une quantité suffisante de tissu (GDR) pour les analyses moléculaires, les GDR étant de toute petite taille.

Raffinement : Afin de limiter toute souffrance de l'animal, nous administrerons un anti-inflammatoire immédiatement après la chirurgie et les 2 jours suivants. Les souris auront à disposition de la nourriture gélatinée dans la cage pour faciliter leur alimentation. Enfin, les animaux seront placés sous caméra, permettant une surveillance permanente, si un animal venait à montrer une incapacité à se déplacer, il sera immédiatement euthanasié.

7054. Les rongeurs sont régulièrement utilisés pour la recherche préclinique dans le domaine de la santé humaine. Ils sont notamment inclus dans des études de pharmacocinétique dont le but est de suivre la concentration d'un produit d'intérêt médical dans le sang au cours du temps.

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 rongeurs, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination d'un produit dans l'organisme des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier un produit.

Ce projet englobe plusieurs études et pour chacune le nombre d'animaux nécessaire sera calculé, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Par ailleurs des études préliminaires aux études de pharmacocinétiques pourront permettre des mises au point de techniques dans le but de diminuer le nombre ou la quantité de prélèvements (par exemple : implantation de cathéter veineux ou techniques de microsampling).

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 soit sur animal anesthésié au préalable, par ponction directe, soit vigile, via un cathéter ou par microsampling (technique permettant de faire des prélèvements de volume sanguin très faible et donc permettant de faire légèrement plus de prélèvements sur le même animal et donc de réduire le nombre total d'animaux utilisés). Au total, 10 000 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

Ce type de projet ne nécessitant pas d'hébergement individuel, les animaux seront en collectivité avec un enrichissement du milieu adapté, à l'exception des animaux ayant un cathéter en place (duodéal ou veineux). En effet, ces derniers nécessitent une surveillance plus poussée afin que les animaux ne s'arrachent pas le cathéter entre eux et pour une détection précoce de surinfection ou de douleurs post-opératoires. Donc une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement, présence de jouets...

7055. Les perturbateurs endocriniens (PE) aussi appelés leurres hormonaux désignent toute molécule ayant des propriétés semblables à nos hormones endogènes. Ces molécules agissent de la même façon ou s'opposent à l'action des hormones de notre corps modifiant la santé de l'individu. Les PE ont des effets négatifs sur la croissance, le développement, le comportement, la production et le stockage de l'énergie, la fonction sexuelle et reproductrice. Nous sommes, dans les pays industrialisés, de plus en plus exposés à plusieurs types de PE (pesticides, herbicides, agents de polymérisation du plastique (bisphénol A (polycarbonate, résines époxy), phtalates (PVC)), résidus d'incinérateur (dioxines) ou toxines produites par les moisissures des céréales) à travers notre mode de vie (alimentation, boisson, objets usuels, produits d'entretien, cosmétiques). Durant les 1000 premiers jours de vie, recouvrant la grossesse et les deux premières années, les individus sont particulièrement sensibles. Cette période est critique car elle détermine la santé à venir de l'adulte, les maladies pouvant se déclarer 20 voire 50 ans après l'exposition. Les mécanismes d'action des PE restent mal connus et les preuves chez l'homme (lien entre exposition périnatale et maladie chez l'adulte) sont difficiles à établir. Notre stratégie est d'analyser les testicules (infertilité) et la prostate (cancer de la prostate) d'animaux adultes exposés quelques jours à la naissance à un PE puis traités ou non par une molécule qui pourrait reverser l'action du PE. Notre but est d'identifier (i) des marqueurs d'action des PE dans les organes adultes. Ces biomarqueurs seraient des indicateurs d'action des PE pour identifier l'activité et la dangerosité d'autres molécules (milliers de molécules industrielles non testées à l'échelle mondiale) et apporteraient des arguments pour modifier la réglementation ; (ii) pour tenter d'identifier des molécules permettant de reverser l'action des PE au niveau de la fertilité masculine avec pour objectif à plus long terme des molécules permettant de traiter cette affection.

Remplacement : Nous utilisons des rats de laboratoire car il n'existe pas de modèle de culture cellulaire permettant de mimer l'action à long terme des PE et d'identifier des biomarqueurs sur la prostate et les testicules adultes. De plus, le modèle animal permet d'étudier l'action globale du PE (la molécule elle-même ainsi que ses métabolites), ce qui n'est pas possible en culture cellulaire. Réduction : Le nombre de rats nécessaire pour l'expérimentation est calculé par un biostatisticien du centre de recherche et doit aussi répondre aux directives toxicologiques de l'OECD (organisme de coopération et de développement économique) afin que nos travaux puissent être pris en considération par les autorités de réglementation européennes sur les PE. Nous avons des collaborations avec plusieurs équipes de recherche travaillant sur d'autres organes (cœur, foie, rate, muscle, poumon, rein, tissu adipeux) afin d'optimiser l'utilisation des animaux lors de ces expériences. Le nombre total d'animaux est de 660. Raffinement : Les traitements n'induisent pas d'altération de l'état général de l'animal. Les animaux sont maintenus dans un environnement enrichi (minimum 2 rats par cage, ajout d'objet : buchettes de pouliot) ; les techniques d'injection sont appropriées à l'âge et à l'espèce animale.

7056. D'après l'OMS, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. On comptait effectivement en 2012, 8,2 millions de décès liés à la maladie. Les lymphomes et les leucémies représentent plus de 500 000 cas chaque année dans le monde. Les lymphomes et leucémies sont des cancers dits liquides ou sanguins car ils touchent le sang et la moelle osseuse pour les leucémies et le système lymphatique (lymphocytes) pour les lymphomes. A ce jour, il existe plusieurs types de traitements contre ces deux types de cancers reposant le plus souvent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la radiothérapie. Cependant, ces traitements ne permettent pas une rémission de ces cancers dans 100% des cas (de façon générale 20% des patients atteints de leucémie et 34% des patients atteints de lymphome ne survivent pas à la maladie). Il est donc important de développer de nouvelle génération de traitements anticancéreux contre ce type de cancers dits liquides ou sanguins.

Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements antitumoraux innovants. Dans un premier temps, la croissance de différentes lignées de cellules tumorales dites liquides sera étudiée afin de tester dans un second temps l'efficacité de différents produits antitumoraux sur ces différentes lignées cellulaires tumorales.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable une leucémie ou un lymphome. En effet, ces deux types de cancers touchent de nombreuses cellules et organes différents. En outre, la culture cellulaire ne permet pas de modéliser les différentes interactions cellulaires entre les cellules tumorales, leur stroma et les cellules immunitaires de l'hôte.

De ce fait, l'efficacité de ces nouveaux traitements antitumoraux sera testée sur un modèle murin immunodéprimé à la fois pour permettre une pousse tumorale et également pour empêcher toute réaction de rejet du traitement administré (traitement à base de cellule humaine).

Les cellules cancéreuses pourront être suivies par imagerie de bioluminescence au cours du temps. Cette méthode apporte plusieurs avantages. C'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. Elle permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés tout au long de l'étude. D'un point de vue éthique, cette technique permettra également de visualiser le développement des cellules cancéreuses dans l'organisme (impossible à visualiser à l'œil nu) et donc de déterminer des points limites plus prédictifs. Lors de ce projet, 5 études de caractérisation de la croissance tumorale de différentes lignées de cellules tumorales dites "liquides" seront réalisées. Pour chacune de ces études, 43 souris seront utilisées soit un total de 215 souris. 5 études d'évaluation de l'efficacité de différents traitements anti-tumoraux seront également réalisées. Pour chacune de ces études, 45 animaux seront nécessaires soit un total de 225 souris pourront être utilisé. De ce fait, au maximum 440 souris seront utilisées pour l'ensemble du projet.

La souche de souris utilisée étant immunodéprimée, une attention toute particulière sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Au cours de chaque étude, les animaux seront observés quotidiennement

afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien-être de l'animal. Une pesée quotidienne sera également réalisée tout au long de l'étude après injection des cellules tumorales. Toute anomalie clinique observée sera rapportée à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique plus approfondi. Des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférence avec les produits testés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc.).

7057. Diabète de type 2 (DT2) et obésité sont des maladies métaboliques dont la croissance mondiale évolue de façon épidémique. Selon l'OMS, en 2014 il y avait dans le monde 600 millions d'adultes obèses et 422 millions de diabétiques (dont 90% de DT2). Il est difficile de déterminer les causes de ces maladies tant les origines sont multiples. Des données récentes suggèrent que les lipopolysaccharides (LPS), des molécules issues des bactéries présentes dans notre intestin, pourraient être l'une des causes de ces maladies. En effet, une légère augmentation des LPS dans le sang est associée à une alimentation riche en graisse et au développement de ces maladies métaboliques. De plus, il a récemment été montré que ces LPS entraînent l'augmentation d'une hormone dans le sang, le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) ; molécule qui est elle-même capable de stimuler la sécrétion d'insuline, dont le rôle dans le développement du DT2 et de l'obésité est avéré.

Le premier objectif de notre travail sera de comprendre comment ces LPS dérèglent le métabolisme du GLP-1, d'élucider les mécanismes moléculaires. Le deuxième objectif portera sur les conséquences physiologiques de cette cascade LPS/GLP-1/insuline lors d'un régime riche en graisse.

Les mécanismes moléculaires seront étudiés par des expériences *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* afin d'étudier les effets des LPS sur la synthèse/sécrétion/dégradation du GLP-1 (N=228 souris). Nous travaillerons sur le modèle souris, sur des explants intestinaux de souris et sur deux lignées cellulaires murines capables de produire du GLP-1. Des approches pharmacologiques et génétiques seront également utilisées. Pour le deuxième objectif, nos études seront réalisées *in vivo* sur des souris nourries avec un régime riche en graisse et implantées ou non avec des pompes osmotiques permettant une infusion continue de LPS pendant 28 jours. Ces expériences seront réalisées chez des souris sauvages et déficientes en protéine de transfert des phospholipides (PLTP) car celles-ci sont plus sensibles aux LPS (N=160 souris). Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 388 souris.

Nos expériences répondront aux exigences de la règle des 3R. Le « remplacement » est pris en compte par l'utilisation de cultures cellulaires et d'explants intestinaux. Les résultats obtenus *in vitro* seront testés *ex vivo* sur des explants. Cela permet aussi de « réduire » le nombre d'animaux (trois explants/souris). La « réduction » est également appliquée par l'utilisation de l'imagerie dynamique qui permet de suivre la distribution du glucose dans différents organes : technique précise et fiable, utilisation d'une souris pour plusieurs temps. Les pompes osmotiques délivrant le LPS en continu participent au « raffinement », cela évite trois injections quotidiennes et réduit donc la douleur et le stress des animaux. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale et sur des plaques chauffantes. De l'ibuprofène (12g/mL) sera administré dans l'eau de boisson 1 jour avant et 4 jours après les chirurgies avec réveil. Les animaux seront suivis quotidiennement et des points limites seront déterminés. Toutes ces procédures seront réalisées par des expérimentateurs formés au bien-être animal. Le milieu d'hébergement sera enrichi avec des feuilles de papier.

7058. L'électrotransfert d'ADN a été très largement utilisé *in vitro* pour transférer des bactéries, des levures mais aussi des cellules animales comme des cellules souches ou encore des cellules différenciées. Ce procédé d'électro-génotherapie (EGT) est actuellement bien caractérisé chez l'animal et fait l'objet des toutes premières évaluations cliniques.

En effet, pour obtenir une biodisponibilité optimale, l'ADN est généralement directement inoculé dans le tissu cible. Puis, on utilise un dispositif expérimental d'électrotransfert comportant un générateur d'impulsions électriques (électropulsateur) auquel sont reliées des électrodes placées autour ou dans le tissu cible. Les impulsions électriques sont générées par l'électropulsateur et appliquées après inoculation de l'ADN à l'aide des électrodes.

Le muscle ciliaire lisse nous est apparu comme une cible idéale de thérapie génique :

- (i) seul muscle intraoculaire, il serait potentiellement utilisable comme « organe sécréteur » pour produire des protéines dans l'œil, à l'image du muscle squelettique électrotransféré sécrétant des protéines dans la circulation générale ;
- (ii) sa localisation stratégique au carrefour des segments antérieur et postérieur de l'œil permettait d'envisager une sécrétion dans les deux segments oculaires ;
- (iii) il est situé à proximité de la surface oculaire et constitué de cellules non neuronales ce qui rendrait son ciblage faiblement invasif et potentiellement sans conséquence sur le cheminement de l'information visuelle.

Cette étude sera réalisée sur l'espèce Lapin (*Oryctolagus Cuniculus*) pour démontrer la faisabilité de la technique d'Electro-transfection, procédure invasive de façon chirurgicale d'une durée inférieure à 5 minutes. L'ensemble de l'étude couvrira autant la faisabilité que les mises au point de différents paramètres, et nécessitera environ 204 Lapins. Le nombre maximum de prélèvements sera de 3 prélèvements (ponction oculaire d'humeur aqueuse et de vitré) sur la cinétique d'expression de la protéine.

Dans le cadre de la règle des 3R :

1/le modèle Lapin est le seul modèle expérimental pour démontrer la faisabilité de notre technologie, d'un point de vue physiologique, de la morphologie de l'œil, et du coût lié à l'expérimentation. En effet, la faisabilité ainsi que les efficacités précliniques chez le rat ont été déjà montrées. Pour le développement du dispositif humain, le lapin à une taille d'œil ainsi

que le muscle ciliaire proche de l'homme (le cochon ne pouvant être utilisé pour le développement du dispositif à cause de l'épaisseur de la sclère et la forme de la cornée).

2/le nombre d'animaux dans chaque étude a été particulièrement étudié pour obtenir un nombre suffisant d'yeux (obtention d'assez de données pour obtenir des statistiques) sans en utiliser excessivement.

3/des points critiques sont prévus en cas de non production de la protéine dans l'œil : des animaux seront sacrifiés ou études arrêtées si les animaux présentent des inflammations oculaires trop importantes. De plus, il est à noter que pour la réduction de la souffrance de l'animal, la procédure d'électrotransfert est réalisée sous anesthésie générale.

7059. Les maladies parodontales, qui touchent le parodonte, c'est à dire les tissus de soutien de la dent, entraînent une réduction de l'os de soutien (os alvéolaire) et de la gencive (« déchaussement » des dents) et conduisent à la perte des dents en cas d'absence de traitement. De même, l'extraction de dents entraîne également cette réduction de l'os de soutien et de la gencive. Cette perte osseuse peut avoir un effet négatif sur le résultat de thérapies ultérieures destinées à restaurer la dentition perdue. Par exemple, cela peut rendre difficile le positionnement d'un implant et ainsi compromettre cette restauration. Afin de remédier à ces pertes potentielles, un certain nombre de techniques visent à préserver l'os de soutien et réduire ainsi la perte osseuse. Il s'agit par exemple de l'utilisation de divers matériaux de greffe osseuse.

Ce projet a pour objectif de suivre l'évolution au cours du temps de substituts de greffe osseuse dans un modèle de défaut osseux créé au niveau de la mandibule par extraction dentaire chez le mini-pig YUCATAN.

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 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 greffe osseuse à visée dentaire, réalisé chez le mini-pig YUCATAN, est un modèle largement décrit dans la littérature car la taille de ses dents est très proche de celle de l'homme, permettant une utilisation translationnelle aisée des techniques et matériaux utilisées 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.

Deux phases sont prévues dans ce projet :

Dans un premier temps, le modèle de défaut osseux par extraction dentaire suivi d'une phase d'implantation d'implants dentaires sera effectué chez 4 animaux afin d'évaluer la faisabilité de ce projet sur un petit nombre d'animaux avant d'augmenter le nombre d'individus dans chaque étude. Pour cette première étape, un maximum de 12 mini-pigs YUCATAN sera utilisé.

Dans un second temps, le même type d'étude sera réalisé, mais avec un nombre d'animaux plus importants, permettant l'évaluation de différents substituts de greffe osseuse seront évalués au cours du temps. Pour cette seconde étape, un maximum de 240 mini-pigs YUCATAN sera utilisé (10 études comprenant 24 individus) permettant d'évaluer l'efficacité de plusieurs substituts de greffe osseuse.

Pour ce projet, un total de 252 mini-pigs seront utilisés.

L'évaluation des produits implantés se fera selon deux modalités :

- Histologie et Immuno-Histologie :

- Imagerie par rayon X (CT et/ou  $\mu$ -CT) :

Le recours à l'imagerie médicale non invasive permet de suivre macroscopiquement et au cours du temps l'évolution des différents composants du défaut osseux dentaire. Le recours à cette méthode permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car le même animal peut être suivi tout au long de l'étude et participe à la diminution du nombre d'animaux utilisé (Règle des 3 R). De plus, c'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen.

7060. L'objectif principal de notre équipe de recherche est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule. Il faut accrocher le radioélément à un vecteur grâce à un ligand (qui est un lien) afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps entiers, fragments, Affitins, liposomes, etc...), de plusieurs ligands et de plusieurs radioéléments, certains connus qui servent de références et des nouveaux.

L'objectif de ce projet est de cibler le myélome multiple murin en utilisant 2 modèles de souris possédant un système immunitaire.

Deux types de radioéléments, alpha et bêta, qui ont des énergies et des parcours d'émissions différents, permettent de réaliser des RIT (radioimmunothérapie) alpha et bêta.

Avant de réaliser ces études de RIT, il faudra faire des escalades de doses, c'est à dire des injections de doses croissantes du vecteur radiomarqué avec chaque radioélément pour déterminer la Dose Limite Tolérée (DLT).

Escalades de doses

Pour chaque vecteur et chaque radioélément, une escalade de doses est indispensable pour déterminer cette Dose Maximale Tolérée (DMT) qui permet de choisir la Dose Limite Tolérée (DLT).

Plusieurs radioéléments et plusieurs vecteurs seront évalués pour permettre la mise en place de nouveaux traitements de radioimmunothérapies et les comparer.

72 souris seront nécessaires pour cette étude.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme.

Règle des 3R :

Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests *in vitro* sur les cellules tumorales. Diminuer le nombre d'animaux nécessaires à nos études en développant par la suite l'imagerie pour les études de suivi thérapeutique.

Le nombre d'animaux nécessaires à cette saisine prend en compte cette règle.

Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie.

7061. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Parmi elles se trouve l'infarctus du myocarde (IM). L'IM est dû à l'occlusion d'une artère coronaire, conduisant à la mort des cellules cardiaques normalement irriguées par ce vaisseau, au remodelage du tissu (apparition d'une fibrose) et à une perte de fonction cardiaque. Le cœur ne possédant des capacités de régénération que très limitées, la maladie progresse alors vers un stade d'insuffisance cardiaque chronique pour lequel il n'existe aujourd'hui aucun autre traitement que la transplantation cardiaque. Cependant, cette approche présente de nombreuses limitations et il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies de réparation cardiaque.

Ce projet a pour objectif de tester l'efficacité d'un nouveau traitement permettant de stopper le phénomène de fibrose, acteur central dans la progression de la pathologie. En effet, l'intervention à un stade précoce de la maladie permettrait de limiter son extension et d'améliorer la survie des patients atteints.

Ce projet s'organise donc autour de la question : peut-on prévenir les complications post-IM par l'utilisation d'un biomatériau anti-fibrose ?

Afin de tenter de répondre à cette question, ce projet de recherche se déroulera en 3 étapes :

- Evaluation chez le rat *Wistar* de l'efficacité d'un matériau de 1ère génération pour la prévention de la fibrose et de la détérioration cardiaque post-IM. Ce biomatériau a été testé dans une autre pathologie fibrotique et a montré des résultats très encourageants. En cas de résultats positifs, cette étude permettra de fournir une preuve de concept de l'utilisation du matériau.

- Optimisation des propriétés et de la formulation du biomatériau afin de l'adapter à une utilisation chez l'Homme (étape ne nécessitant pas d'animaux). Cette étape se basera sur les résultats obtenus dans l'étude pilote utilisant le biomatériau de 1ère génération, et aboutira au développement d'un biomatériau de 2nd génération.

- Evaluation chez le rat *Wistar* de l'efficacité du biomatériau de 2nd génération.

Au total, 126 rats *Wistar* seront utilisés pour ce projet afin de permettre une analyse statistique fiable et robuste des résultats. Ces animaux seront traités de manière à limiter leur angoisse et leur souffrance (anesthésie et analgésie) et feront l'objet d'une attention continue au sein de l'animalerie.

Dans le cas de résultats positifs, ce traitement pourrait trouver toute sa place en clinique alors qu'il n'existe aujourd'hui aucun traitement permettant de prévenir efficacement les complications cardiaques post-infarctus.

7062. L'anesthésie sélective des racines nerveuses cervicales est utilisée en médecine humaine dans le diagnostic et le traitement des atteintes douloureuses et paralysantes des bras et des épaules par compression des racines des nerfs cervicaux à leur sortie du canal vertébral. Chez le cheval, une affection similaire est suspectée lors d'un bilan lésionnel d'arthrose cervicale associé à une boiterie d'un membre antérieur.

Les objectifs de l'étude sont de :

1. déterminer le volume et la concentration d'anesthésique local adéquat pour la réalisation d'une anesthésie sélective d'une seule racine ;

2. décrire les effets cliniques d'une anesthésie sélective d'une racine nerveuse cervicale (C6, C7 et C8) chez le cheval sain ;

3. caractériser avec les outils actuellement disponibles les zones de désensibilisation cutanées correspondant à l'anesthésie radiculaire sélective (C6, C7 et C8) et de les comparer avec les données anatomiques bibliographiques ;

Le développement de cette technique et l'étude de ses effets a pour but d'évaluer ensuite son utilité comme aide diagnostique chez des chevaux présentant naturellement l'affection.

Après le développement de la méthode d'injection autour de la racine à l'aide de l'échographie sur encolures isolées provenant de cadavres (technique d'insertion de l'aiguille, étude de la diffusion d'un colorant autour de la racine en fonction du volume injecté), 1 cheval pilote puis 6 chevaux seront utilisés pour répondre aux objectifs 1, 2 et 3.

Les risques de complications comprennent une paralysie temporaire du membre antérieur du côté de l'injection et l'apparition temporaire d'instabilité et de faiblesse des membres antérieurs si le volume d'anesthésique local est trop

important et diffuse trop vers le canal médullaire. Ces risques seront minimisés par le raffinement de la technique d'injection sur cadavres avant de commencer sur chevaux vigiles.

Dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : la technique d'injection sera tout d'abord développée sur cadavre afin de limiter le nombre d'animaux vivants nécessaire. Toutefois, l'utilisation d'animaux de l'espèce-cible, les chevaux, ne peut être complètement remplacée, le but tant de documenter un tableau clinique et d'ensuite en faire un test diagnostique à effectuer sur cheval vivant.

Réduction : la limite du nombre d'animaux a été décidée dans le respect de la règle des 3R avec 7 chevaux pour développer et étudier la technique clinique. Il est espéré que 4 chevaux seront suffisants pour documenter suffisamment la technique. Toutefois, 1 à 3 chevaux supplémentaires sont prévus dans le cas où une confirmation des informations obtenues s'avérerait nécessaire pour une validation de la technique.

Raffinement : toutes les mesures ont été prises afin de supprimer et/ou réduire la souffrance des animaux.

7063. La résistance aux bêta-lactamines parmi les entérobactéries et les *Pseudomonas spp* a considérablement augmenté et pose aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Cette résistance est due à l'émergence d'enzymes capables d'hydrolyser les bêta-lactamines. Parmi les enzymes les plus préoccupantes, on retrouve les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE), mais aussi les carbapénémases capables d'hydrolyser les carbapénèmes. Cela est d'autant plus inquiétant que les carbapénèmes restent souvent la seule option thérapeutique disponible devant une infection à bactéries à Gram négatif multirésistantes.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité d'une nouvelle molécule (NXC-1) présentant un nouveau mécanisme d'action, dans un modèle d'infection urinaire expérimentale chez la souris et de comparer cette activité à une molécule de référence, le méropénème (carbapénème).

Il est indispensable de pouvoir faire une démonstration *in vivo* de l'efficacité de cette nouvelle option thérapeutique, qui pourrait représenter une des rares options encore actives sur certaines entérobactéries ou *Pseudomonas* multirésistants fréquemment isolés dans les infections urinaires compliquées.

Pour cela, 288 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit une infection urinaire les souris seront réparties en 5 groupes, 2 groupes seront traités avec NXC-1 (60mg/kg et 120mg/kg), 1 groupe sera traité avec du méropénème (120mg/kg) et 2 groupes ne recevront pas de traitement (animaux témoins début et fin de traitement). Six jours après l'infection, les animaux seront euthanasiés et les reins seront prélevés afin de déterminer les charges bactériennes.

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

7064. L'allaitement exclusif pendant 6 mois est recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé car l'allaitement est bénéfique pour la santé de l'enfant, et ces bénéfices perdurent jusqu'à l'âge adulte. Si le taux d'allaitement a augmenté en France au cours de ces 20 dernières années (65% en sortie de maternité, en 2014), il reste très inférieur à celui des pays d'Europe de Nord (95% en Norvège) et surtout, il chute très vite dans les premières semaines de lactation. Parmi les causes d'arrêt prématuré de l'allaitement il y a la crainte des mères de ne pas avoir suffisamment de lait pour nourrir correctement leur enfant. Pour évaluer objectivement ces craintes et afin d'élaborer des stratégies d'augmentation de la production de lait maternel, nous proposons de développer une méthode peu invasive, applicable aux rongeurs, de mesure de la production de lait maternel. En effet, cette mesure est classiquement effectuée par pesée des mères et de leurs nouveau-nés, avant et après tétée. La différence de poids est supposée être égale au volume de lait produit. Mais les résultats sont en général peu fiables. La méthode que nous nous proposons de tester dans cette saisine consiste à mesurer l'enrichissement en deutérium ( $^2\text{H}$ ) de l'eau corporelle de la mère suite à une injection d'un bolus d'eau enrichie en deutérium (eau deutérée) et à mesurer les flux de lait de la mère aux ratons à partir de la dilution du deutérium. Le deutérium  $^2\text{H}$  est un isotope stable de l'hydrogène, et donc non radioactif et non toxique. Nous appliquerons cette méthode à deux études):

1. Nous testerons l'hypothèse qu'une mère de nouveau-nés RCIU (nés avec un Retard de Croissance Intra-Utérin) produit moins de lait qu'une mère de nouveau-nés de poids normal. Le retard de croissance intra-utérin (RCIU), qui représente près de 10% des naissances en France, augmente non seulement la mortalité néonatale mais aussi le risque de maladies chroniques à l'âge adulte (obésité, hypertension, diabète de type 2, infarctus du myocarde). Nous avons montré que le lait maternel de mères RCIU avait une composition différente du lait de mères "normales" mais, faute de mesure adéquate, nous n'avons pas conclu sur les volumes de lait produit.

2. Nous testerons l'hypothèse que la supplémentation des mères en citrulline pendant la gestation et la lactation agit sur la production de lait et éventuellement sur la croissance des petits. La citrulline est convertie au niveau rénal en arginine, le précurseur endogène de l'oxyde nitrique (NO); et NO est un composé reconnu comme impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, favorisant potentiellement les flux de biosynthèse des composants du lait maternel.

Nous respecterons la règle des 3 R:

1. Remplacement :

Il s'agit d'une étude *in vivo* visant à évaluer des stratégies nutritionnelles sur la production de lait maternel. Il n'existe donc pas de modèle *in vitro* permettant le remplacement de l'étude animale.

### 3. Réduction

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum. Le nombre de rat(e)s prévu (40), supérieur au besoin de 39 rat(e)s, prend en compte i) les risques de non fécondation pour les rates gestantes (environ 10% sur la base de l'expérience antérieure de l'UMR); ii) la nécessité de disposer de portées expérimentales naturellement constituées d'au moins 3 ratons mâles et 3 ratons femelles pour s'affranchir de l'origine biologique et du genre dans les impacts mesurés; (iii) la nécessité d'avoir au moins 6 mères différentes par groupe expérimental pour obtenir suffisamment de ratons d'origine biologique différente.

### 3. Raffinement

Pour les animaux, l'évaluation de la douleur sera faite à l'aide d'observations physiologiques (poids), comportementales (consommation de nourriture, fuite ou défense de l'animal à la manipulation, activité) et en fonction de l'apparence de l'animal (poil, posture). Aucune souffrance (ou très faible) n'est attendue lors des manipulations prévues. Les animaux seront observés tous les jours y compris le Week-end.

7065. Les sérums anti-lymphocytaires (SAL) sont des immunoglobulines ciblant des cellules immunitaires humaines, les lymphocytes, et sont largement utilisés en thérapeutique humaine pour prévenir de manière efficace les rejets de greffe. Leur utilité a aussi été prouvée dans de nombreuses autres applications, comme le traitement du rejet aigu de greffe, la réaction du greffon contre l'hôte en greffe de moelle, ou l'anémie aplasique par exemple.

Les SAL sont obtenus en immunisant des lapins ou autres espèces animales contre des lymphocytes humains (cellules essentielles dans l'initiation des rejets).

Actuellement, les SAL proposés commercialement sont principalement produits chez le lapin. L'objectif du projet est de proposer un nouveau SAL d'origine porcine, possédant de nouvelles caractéristiques et moins d'effets secondaires chez les patients traités. En effet, les complications associées au traitement avec les SAL chez l'homme sont en partie liées à la présence d'antigènes xénogéniques. Ces antigènes présents dans les SAL d'origine animale ne sont pas synthétisés naturellement chez l'être humain et induisent une réaction immune chez le patient traité. Ce projet propose de produire un sérum anti-lymphocytaire à partir de porcs n'exprimant pas deux xéno-antigènes majeurs, et dont l'immunogénicité sera réduite par rapport à des porcs classiques.

De plus, l'utilisation du porc au lieu du lapin pourrait, compte tenu de leur poids supérieur et des connaissances sur leur élevage, permettre l'utilisation de moins d'animaux pour la production de ces molécules.

L'étape principale pour l'obtention de ce SAL est l'optimisation de la procédure d'immunisation dans cette espèce, afin d'obtenir un sérum immun efficace ainsi que des immunoglobulines polyclonales d'un titre et d'une affinité satisfaisante pour les applications thérapeutiques proposées.

Les résultats obtenus dans les premières phases du projet nous ont permis de valider plusieurs paramètres importants, mais une optimisation complémentaire est nécessaire pour obtenir une réponse immune satisfaisante dans l'espèce porcine. Dans le procédé d'obtention d'un SAL, la particularité principale réside dans l'antigène à utiliser pour les immunisations : des cellules entières.

Les paramètres qui vont être testés dans le cadre de ce projet d'optimisation sont : sélection du meilleur adjuvant (tous décrits dans l'espèce porcine), ainsi que l'influence de la viabilité de l'antigène (comparaison cellules entières vivantes versus culots secs remis en suspension).

Nous appliquerons ensuite le protocole sélectionné dans les étapes précédentes à notre modèle d'étude, un porc génétiquement modifié n'exprimant que deux xéno-antigènes majeurs chez l'homme. Le nombre maximum de porcs utilisés dans cette étude est évalué à 21.

De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

7066. Le cortex surrénalien est un organe essentiel du système endocrinien impliqué dans la médiation de la réponse au stress et régule des paramètres importants de l'homéostasie du corps. Le cortex surrénalien produit différents types d'hormones notamment les minéralocorticoïdes (aldostérone) et le cortisol. Toute perturbation de la fonction du surrénal conduit à des troubles graves, y compris la maladie d'Addison (maladie génétique autosomale dominante) entraînant une production insuffisante d'hormone et le syndrome de Cushing (surproduction des minéralocorticoïdes). Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents au développement de la glande surrénale sont très peu étudiés et de ce fait il n'existe pas de thérapie définitive pour ces maladies. Dans le cas de maladie d'Addison, le seul traitement qui existe est une hormonothérapie à vie qui doit être très strictement surveillée. L'ablation de la glande surrénale est préconisée dans le cas de syndrome de Cushing.

La tumeur de la glande surrénale constitue une 2ème pathologie majeure qui a pour cause une prolifération anormale des cellules surrénaliennes. En effet, les cellules de la glande surrénale se renouvellent régulièrement chez l'adulte, permettant ainsi le remplacement des cellules endommagées. Ce processus est régulé par des molécules de signalisation mal connues à ce jour. De plus, les caractéristiques spécifiques (expression des molécules propres à ces cellules, leur origine et leur localisation au sein des surrénales) des cellules souches de la corticosurrénale et les mécanismes selon lesquels ces cellules se renouvellent restent inconnues.

Les études menées dans notre laboratoire ont identifié une molécule de signalisation qui est sécrétée par les cellules capsulaires et est nécessaire pour maintenir le cortex surrénalien tout au long de la vie.

Dans cette demande d'autorisation d'expérimentation animale, nous envisageons une série d'expériences qui permettront d'identifier les populations de cellules souches qui sont responsables du renouvellement du cortex surrénalien. Nous rechercherons les marqueurs spécifiques exprimés par les cellules qui vont se différencier et migrer dans le cortex. Ce qui nous permettra de déterminer la relation entre les différents types de cellules au sein de la surrénale et le temps nécessaire au remplacement des cellules stéroïdogéniques. Nous effectuerons des expériences génétiques utilisant des souris transgéniques générées précédemment pour comprendre les événements moléculaires qui contrôlent le renouvellement cellulaire dans des conditions normales. Enfin, nous tenterons d'isoler des populations de cellules souches de souris adultes et de développer des techniques de culture qui devraient permettre la propagation des cellules souches à long terme et le développement d'organoïdes surrénaliens *in vitro*. Les pathologies surrénaliennes présentent un biais du sexe avec des tumeurs des glandes surrénales plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes. Il est probable que cela soit dû au temps du renouvellement cellulaire qui est spécifique au sexe. Nous allons donc procéder à une analyse détaillée à la fois chez les mâles et les femelles afin d'identifier les différences potentielles entre les sexes.

L'ensemble des résultats de ces expériences produira une source riche de nouvelles connaissances sur la biologie et la physiologie des glandes surrénales. Nous nous attendons à identifier la population de cellules souches et les voies de signalisation nécessaires au maintien de la fonction surrénalienne normale pendant toute la vie. La modulation de ces voies pourrait, à plus long terme contribuer au traitement des patients qui ont trop peu (ou trop) de cellules stéroïdogéniques. Compte tenu de la complexité du renouvellement de l'organe et l'absence actuelle d'un système de culture approprié d'organoïdes, l'utilisation d'un modèle *in vivo* est essentielle. Dans le cadre de ce projet, nous utiliserons 1479 animaux (903 souris adultes et 576 embryons). Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous essayons de regrouper nos expérimentations sur les échantillons prélevés (Réduction). Au cours de ces expériences, nous tenterons d'isoler les cellules souches et de développer des systèmes de culture d'organoïdes. Cette nouvelle technologie permettra à toute la communauté d'étudier de nombreux aspects de la biologie de la corticosurrénale en évitant l'utilisation de l'animal vivant (Remplacement). Nous portons une attention particulière à la survenue de tout phénotype dommageable qui nous dictera la fin de notre expérimentation (Raffinement).

7067. La recherche et le développement de nouveaux biomatériaux en chirurgie orthopédique humaine nécessitent après les essais *in vitro* des études *in vivo*. Généralement, la biocompatibilité est testée sur des petites espèces (rats, lapins...) puis dans un modèle biofonctionnel ie proche de l'utilisation finale chez l'Homme (cage de fusion vertébrale, modèle de fracture...) dans une grande espèce (ovins, caprins, chiens...) afin d'introduire des sollicitations biomécaniques et pour les matériaux ostéoconducteurs, d'évaluer l'effet taille de l'implant sur la colonisation osseuse. Dans les modèles *in vivo* que nous utilisons, nous analysons la dégradation du biomatériau, sa substitution ou sa colonisation osseuse par des méthodes histologiques (microscopie photonique, microtomodensitométrie, analyse d'image...), l'absence d'effets systémiques néfastes...

Nous souhaitons tester différents biomatériaux dans différents sites osseux (os long, os court, os cortical, os trabéculaire, os membranaire...) ainsi qu'en site musculaire afin de vérifier leur capacité ostéo-inductrices (capacité à développer de l'os dans un site non osseux). Les espèces retenues sont les ovins et les caprins. Le choix entre ces deux espèces dépend des sites implantés (accessibilité du site, références bibliographiques plus ou moins nombreuses, etc.). Par étude, nous testons quatre nouveaux biomatériaux que nous comparons à un matériau de référence et à un témoin vide avec deux délais d'implantation. Afin de réaliser des tests statistiques (non paramétriques), nous avons besoin de 8 explants par type d'implants, par site et par délai. En fonction de la taille de l'implant, 4 à 6 biomatériaux peuvent être implantés par site. Pour deux délais d'implantation, il nous faut donc 24 à 48 animaux. Envisageant de réaliser cinq études dans les 5 prochaines années, nous estimons le nombre de petits ruminants au maximum à 240.

Ces études seront menées dans le respect de la règle des 3R (Biomatériau testé préalablement en culture cellulaire avant implantation *in vivo*, utilisation de tests statistiques non paramétriques, gestion de la douleur per et postopératoire, définition des points-limites...) et en respectant au plus près la norme ISO 10993-6 afin d'éviter que de nouvelles études animales soient nécessaires dans le cas d'une éventuelle demande de l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) pour l'autorisation de la mise sur le marché des dispositifs médicaux tels que les biomatériaux.

7068. La maladie d'Alzheimer est une maladie liée au vieillissement caractérisée par des déficits importants de différents types de mémoire (mémoire à long terme, topographique, épisodique, spatiale, mémoire de travail, etc.). Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité du peptide  $\beta$ -amyloïde est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. L'étude des phénomènes de mémoire nécessitent l'utilisation d'animaux.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité d'un candidat médicament, SYN-028, administré par voie orale, sur la mémoire de la souris injectée en intracérébrale avec le peptide  $\beta$ -amyloïde, impliqué dans la maladie d'Alzheimer et produisant une perte permanente de la mémoire.



Ce composé a déjà été testé à des doses supérieures dans le même modèle, cependant la dose la plus faible à démontré une efficacité et donc l'établissement de la fenêtre thérapeutique (c'est à dire la différence entre la dose efficace sur la mémoire et la dose induisant des effets indésirables) n'est pas possible. L'établissement de la fenêtre thérapeutique est nécessaire pour le développement du candidat médicament. Il est donc nécessaire de tester des doses plus faibles de ce même composé.

Le composé est administré un jour avant l'injection cérébrale du peptide  $\beta$ -amyloïde et pendant 8 jours après celle-ci. L'injection cérébrale est effectuée en conditions aseptiques et sous anesthésie (raffinement). Suivant une période de rémission, les animaux seront testés dans un test évaluant la mémoire spatiale de travail (labyrinthe en Y) et un test évaluant la mémoire topographique. Cette étude veut quantifier le bénéfice de ce traitement à J+8 quand le médicament est encore présent dans l'organisme ainsi que d'évaluer l'effet du traitement à J+21 (non présent dans l'organisme, afin déterminer s'il a un effet réparateur à long terme).

Cette étude comprend 9 groupes d'animaux contenant chacun 12 individus, nous y ajouterons 3 souris pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie, soit un total de 111 animaux. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, tout en s'assurant de la non-utilisation d'animaux surnuméraires (réduction).

Les animaux sont hébergés en cage individuelle après l'injection intracérébrale pour éviter la réouverture de la plaie lors de jeux ou de bagarre dans la cage. Les cages contiennent de l'enrichissement environnemental (raffinement).

Ce candidat médicament a été préalablement testé sur la même souche de souris injectée avec le peptide beta-amyloïde à des doses plus fortes et suivant la même durée de traitement et n'est donc pas toxiques pour l'animal. Les tests de mémoire étant sensibles au stress, les animaux présentant des signes de stress ou une santé fragile seront euthanasiés immédiatement pour éviter toute souffrance inutile.

#### 7069. 1-Objectif scientifique du projet :

La brique élémentaire du muscle squelettique est la fibre musculaire, issue de la fusion de centaines de cellules spécialisées, les myoblastes. Ces fibres musculaires dites squelettiques s'associent entre elles par milliers afin de former les muscles squelettiques responsables de tous les mouvements volontaires. Dans chaque fibre musculaire, le positionnement des noyaux est finement régulé. Les noyaux sont régulièrement espacés le long des fibres musculaires où ils sont localisés à la périphérie. Cette organisation des noyaux dans les fibres est responsable de l'intégrité fonctionnelle d'un volume déterminé de fibre musculaire. Le défaut de positionnement précis des noyaux dans les fibres musculaires matures (agrégation et centralisation) a récemment émergé comme un potentiel facteur contribuant à certaines maladies musculaires : il est ainsi fortement corrélé à certaines myopathies et à des faiblesses musculaires. Nous cherchons à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation des domaines nucléaires dans les fibres musculaires et leur implication dans la fonctionnalité des muscles.

#### 2- Procédures et Retombées attendues :

Notre équipe a réalisé un criblage sur un modèle de fibres musculaires formées *in vitro* afin d'identifier des protéines régulant la formation des domaines nucléaires dans les fibres. Cette approche nous a permis d'identifier un gène qui altère fortement la formation des domaines nucléaires dans les fibres musculaires formées *in vitro*. En effet, l'inhibition de l'expression de ce gène permet d'augmenter l'espace entre les noyaux dans les fibres et pourrait donc constituer une cible de choix afin de rétablir certaines caractéristiques des domaines nucléaires altérées dans différentes myopathies (agrégation des noyaux dans les fibres). Nous souhaitons donc tester si l'inhibition de cette protéine ou si l'expression de formes tronquées dans les fibres musculaires aura un effet sur la localisation des noyaux dans les fibres musculaires. Nous souhaitons aussi utiliser le modèle de régénération musculaire chez la souris afin de tester l'implication de cette protéine dans les phases précoces d'établissement/positionnement des noyaux dans les muscles.

Remplacement : Les conditions de cultures des fibres musculaires *in vitro* ne permettent pas d'obtenir une maturation finale des fibres (la taille des fibres obtenues est inférieure à la taille des fibres *in vivo*) et ne reproduisent pas l'environnement des muscles tel que l'attachement des extrémités des fibres aux tendons et la stimulation par des motoneurones.

Réduction : Un protocole optimisé nous permettra d'utiliser un nombre minimal d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs. Nombre de souris : 441

Raffinement : Des points limites comme la persistance de boîtiers et également le maintien du poids seront définis et pris en compte afin d'exclure certains animaux de l'étude.

7070. Le traitement des plaies chronique est estimé à 41 milliards de dollars aux Etats Unis en 2012, soit 1.6% de l'ensemble des dépenses totales de soins. Parmi les étiologies des plaies chroniques, le diabète est une cause majeure et la prise en charge de ces plaies est difficile et discutée.

Les mécanismes impliqués dans la cicatrisation nécessitent un apport d'oxygène pour leur bon déroulement. Parmi les causes de non cicatrisation, l'hypoxie sous-jacente de la région de la plaie semble inhiber les processus de cicatrisation en bloquant la prolifération des fibroblastes, la production de collagène, l'angiogenèse des capillaires et augmente le risque d'infection.

Chez les sujets diabétiques les plaies chroniques cicatrisent lentement et difficilement plaçant le sujet à risque d'infections et de complications cliniques graves pouvant conduire à l'amputation pour les plaies situées sur le membre inférieur.

L'oxygénothérapie hyperbare (OHB) a été proposée depuis les années 60 pour améliorer la cicatrisation des plaies et diminuer le risque d'amputation chez les patients diabétiques. Les plaies chroniques font ainsi partie des indications reconnues d'OHB par les sociétés de médecine hyperbare (the Hyperbaric Medical Society, Société de physiologie et de médecine Hyperbare). Son utilisation est cependant limitée par le coût et la lourdeur des traitements. Par ailleurs, les mécanismes sous-jacents à cette thérapeutique sont mal connus et les protocoles de réalisation des traitements par OHB restent empiriques.

L'OHB chez la souris diabétique a permis de diminuer les temps de cicatrisation et d'induire la néo-vascularisation. Cependant, la fonctionnalité de la peau cicatrisée n'a jamais été évaluée.

Le projet est d'étudier chez des souris saines et diabétiques, les bénéfices d'un traitement par OHB sur la cicatrisation de plaies (temps de cicatrisation, vascularisation, fonctionnalité des néo-tissus et étude de facteurs et cascades de signalisation). La fonctionnalité du tissu cutané sera testée par la mesure des réponses aux pressions et repose sur une interaction fonctionnelle des systèmes nerveux et vasculaires nécessitant une approche *in vivo*. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation d'animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique des résultats. Ce projet concernera 153 souris au maximum.

Les souris seront suivies avec un soin particulier avec des points limites clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

7071. La maladie d'Alzheimer est une maladie liée au vieillissement caractérisée par des déficits importants de différents types de mémoire (mémoire à long terme, topographique, épisodique, spatiale, mémoire de travail, etc.). Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité du peptide bêta-amyloïde est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. L'étude des phénomènes de mémoire nécessitent l'utilisation d'animaux.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité d'un candidat médicament, SYN-036, administré par voie orale, sur la mémoire de la souris injectée intra-cérébralement avec le peptide bêta-amyloïde, impliqué dans la maladie d'Alzheimer et produisant une perte permanente de la mémoire. Le composé est administré pendant 8 jours. L'injection cérébrale est effectuée en conditions aseptiques et sous anesthésie (raffinement). Suivant une période de rémission, les animaux seront testés dans un test évaluant la mémoire spatiale de travail (labyrinthe en Y). Cette étude veut quantifier le bénéfice de ce traitement à J+7 quand le médicament est encore présent dans l'organisme et quantifier l'effet réparateur de ce traitement, en réévaluant cette mémoire à J+17.

Cette étude comprend 6 groupes d'animaux, contenant chacun 12 individus, nous y ajouterons 2 souris pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie, soit un total de 74 animaux. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, tout en s'assurant de la non-utilisation d'animaux surnuméraires (réduction).

Les animaux sont hébergés en cage individuelle après l'injection intracérébrale pour éviter la réouverture de la plaie lors de jeux ou de bagarre dans la cage. Les cages contiennent de l'enrichissement environnemental (raffinement). Ce candidat médicament a été préalablement testé sur la même souche de souris, aux mêmes doses et suivant la même durée de traitement par nos clients pour l'évaluation des effets indésirables et n'est donc pas toxiques pour l'animal. L'étude des phénomènes de mémoire ne peut s'effectuer sans l'utilisation d'animaux, ces animaux doivent aussi être en bonne santé, et donc les animaux présentant des signes de stress et de souffrance seront euthanasiés immédiatement.

Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de la MA impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapies pour la MA est un des enjeux majeurs pour la communauté scientifique (publique et privée).

7072. La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie liée au vieillissement caractérisée par des déficits importants de différents types de mémoire (mémoire à long terme, topographique, épisodique, spatiale, mémoire de travail, etc.). Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité du peptide  $\beta$ -amyloïde est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. L'étude des phénomènes de mémoire nécessitent l'utilisation d'animaux. Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de deux candidats médicament administrés par voie orale pendant 10 jours, sur la mémoire de la souris *C57BL6J*, couramment utilisée en recherche sur les phénomènes de mémoire, injectée intra-cérébralement avec le peptide  $\beta$ -amyloïde, impliqué dans la maladie d'Alzheimer et produisant une perte permanente de la mémoire. L'injection cérébrale est effectuée en conditions aseptiques et sous anesthésie (raffinement). Suivant une période de rémission, les animaux seront testés dans un test évaluant la mémoire topographique et un test évaluant la mémoire visuelle d'objets, toutes deux déficitaires dans la maladie d'Alzheimer Cette étude comprend 11 groupes d'animaux contenant chacun 12 individus, et nous y ajouterons 3

souris pour palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie. Soit un total de 135 animaux. Ce nombre d'animaux est suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, tout en s'assurant de la non-utilisation d'animaux surnuméraires (réduction). Les animaux sont hébergés en cage individuelle après l'injection intracérébrale pour éviter la réouverture de la plaie lors de jeux ou de bagarre dans la cage. Les cages contiennent de l'enrichissement environnemental (raffinement). Ces candidats médicament ont été préalablement testés sur la même souche de souris, aux mêmes doses et suivant la même durée de traitement par nos clients pour l'évaluation des effets indésirables et n'est donc pas toxiques pour l'animal.

L'étude des phénomènes de mémoire nécessite l'utilisation d'animaux non-stressés et en bonne santé. Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal, où qu'une inflammation due à la l'injection intracérébrale soit notée, l'animal sera euthanasié immédiatement car il aura atteint les points limites définis pour lesquels (i) il ne serait pas éthique de continuer l'expérience et (ii) les données générées ne seraient pas représentatives.

Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de la MA impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapies pour la MA est un des enjeux majeurs pour la communauté scientifique (publique et privée).

7073. Les maladies neurodégénératives, maladies d'Alzheimer et apparentées en particulier, constituent un enjeu de santé publique majeur : l'absence de traitement curatif, conjuguée à l'accroissement de la population concernée par ces pathologies, a un lourd impact humain et sociétal. La compréhension des mécanismes pathogéniques impliqués dans ces maladies est l'une des clés de la découverte de stratégies thérapeutiques innovantes. Elle reste cependant un défi en raison de la complexité de ces mécanismes, qui reflète probablement la complexité du fonctionnement cérébral. Bien que chaque maladie neurodégénérative présente des spécificités telles que les causes, les tissus préférentiellement atteints, les symptômes primaires, soient différents, des similitudes les rapprochent. Ces similitudes, qui mettent en jeu des mécanismes pathogéniques communs, sont de potentielles cibles thérapeutiques. Ces similitudes sont encore mal comprises et il est donc nécessaire de les étudier. En particulier, l'identification de signatures moléculaires communes à plusieurs maladies neurodégénératives est l'un des défis importants à relever et les modèles murins de maladies neurodégénératives représentent des outils précieux pour la réalisation d'un tel objectif. Nos études récentes sur les maladies de Huntington et d'Alzheimer montrent que les tissus cérébraux de souris modèles de ces maladies présentent des signatures moléculaires (transcriptionnelles et épigénomiques) comparables, ce qui conforte l'idée que des mécanismes communs sont à l'œuvre dans ces maladies. L'objectif de l'étude, qui s'inscrit dans un projet d'équipe plus vaste, est de préciser les mécanismes transcriptionnels et épigénétiques impliqués dans trois maladies neurodégénératives - Huntington, Alzheimer, démence à corps de Lewy -, respectivement associées à une dégénérescence préférentielle du striatum, de l'hippocampe et du cortex préfrontal. L'objectif global est de comprendre l'impact de ces mécanismes sur les symptômes comportementaux (cognitifs en particulier) et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Prenant en compte la stratégie des 3R (remplacement, réduction, raffinement) et des calculs de puissance, nous limiterons le nombre de souris utilisées au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement exploitables (N= 96). Par ailleurs, dans un souci de raffinement du projet et du respect du bien-être animal, l'étude sera menée de façon générale à un âge où les animaux ne sont pas atteints de symptômes invalidants. Enfin, un suivi quotidien des souris sera réalisé afin d'anticiper tout signe nécessitant chez l'animal des soins particuliers.

7074. La survenue d'évènements stressants au cours de la petite enfance ou à l'âge adulte est associée à l'apparition, le développement ou l'exacerbation de pathologies digestives. L'implication du stress dans le déclenchement et/ou l'entretien de pathologies intestinales tels que le syndrome de l'intestin irritable (SII) et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dont la maladie de Crohn (MC) a été largement décrit. Ces pathologies digestives multifactorielles sont caractérisées par une augmentation de la perméabilité intestinale, de la sensibilité viscérale, d'une réponse immunitaire d'une inflammation locale plus ou moins importante et d'un déséquilibre de la flore intestinale. Aujourd'hui, il semblerait qu'une des cibles thérapeutiques stratégiques serait de diminuer le déséquilibre de la flore intestinale (probiotique, traitement d'appoint). Cette stratégie contribuerait à maintenir la phase de rémission, prévenir la récurrence des poussées de la MC ou à traiter le SII pour lequel aucune molécule médicamenteuse n'est disponible en Europe. La réduction de ce déséquilibre pourrait être favorisée par un apport oral de peptides antimicrobiens. Ce projet permettra de 1) mieux comprendre la physiopathologie de la maladie (recherche fondamentale) 2) mettre en évidence un traitement d'appoint pour maintenir les phases de rémission (recherche appliquée) et 3) de démontrer les mécanismes d'actions (recherche fondamentale).

Le modèle murin est le modèle qui se rapproche le plus du modèle humain ; les études *in vitro* ne sont pas assez puissante pour appréhender la complexité de la maladie et des interactions entre différents systèmes (système immunitaire, flore intestinale, barrière intestinale ...), c'est pourquoi le modèle animal vivant et en bonne santé est incontournable. Les modèles murins expérimentaux sont devenus indispensables pour l'étude des maladies humaines pour lesquelles il n'existe pas naturellement de pathologie équivalente chez l'animal. Les animaux sont hébergés dans une animalerie conventionnelle réglementaire, leur assurant les meilleures conditions d'environnement pour leur bien-être et maintien en bonne santé. Au cours du protocole, du personnel qualifié observera tous les jours les animaux et leur comportement, afin de détecter d'éventuelles anomalies. Des processus inflammatoires intestinaux non létaux seront induits chez différents groupes expérimentaux regroupant 330 souris, sur un total de 660 souris (330 autres souris seront les témoins

non traitées), qui seront utilisées pour la durée totale de l'étude, ce nombre correspondant au minimum requis pour s'assurer d'une bonne interprétabilité des résultats. Tout sera mis en œuvre pour réduire à un niveau modéré toute douleur et/ou inconfort lié aux traitements.

7075. Une des fonctions majeures de l'intestin est son rôle de barrière qui vise à limiter l'entrée dans l'organisme de composés potentiellement délétères. Cette fonction de barrière est altérée dans de nombreuses pathologies comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le syndrome de l'intestin irritable ou le cancer colorectal. La mise en place de la barrière intestinale et ses régulations sont des mécanismes complexes. Une lignée particulière de souris transgéniques exprime fortement une enzyme appelée CA-MLCK qui présente une altération congénitale de la barrière intestinale. Ceci en fait un modèle d'étude très intéressant pour comprendre les conséquences d'une moins bonne fonctionnalité de la barrière intestinale.

Ce projet qui vise à déterminer si une barrière moins efficace peut induire (i) des douleurs abdominales récurrentes ; (ii) une plus grande susceptibilité à développer une carcinogenèse intestinale ; (iii) une réaction exacerbée aux contaminants alimentaires et aux produits néoformés exogènes et endogènes, ne peut se concevoir que chez l'animal vivant et en bonne santé. Ce projet nécessite l'élevage de 232 souris transgéniques au niveau de l'unité, et de 232 souris contrôles. Ce nombre de souris correspond à des groupes de 8 à 12 animaux, en conformité avec le souci de réduction en conformité avec la règle des 3R, tout en permettant une analyse statistique pertinente. Les conditions d'hébergement seront optimales avec une surveillance quotidienne afin d'assurer le bien-être et la bonne santé des animaux.

7076. L'infertilité mâle est une problématique croissante en productions animales. Ainsi, dans le secteur porcin, 35% des verrats sélectionnés pour la reproduction sont réformés pour leur mauvaise qualité de semence. Des verrats présentant des altérations de la qualité de leur semence sont d'ailleurs identifiés régulièrement par les organisations de sélection porcine. Ce projet de recherche a pour objectif de comprendre les mécanismes responsables des altérations de la spermatogenèse chez des verrats présentant de façon permanente des qualités de semence altérées et porteurs de remaniements chromosomiques. Ce sujet est à ce jour peu documenté chez le porc et seule une étude précédente a mise en évidence chez ces verrats des défauts d'appariements des chromosomes et des anomalies de méthylation de l'ADN spermatique. Dans le cadre de ce projet, au cours des 5 prochaines années, nous envisageons de recruter 10 individus infertiles maximum (porteurs d'anomalies chromosomiques) ainsi que 5 individus normaux témoins, soit 15 verrats totaux maximum. Les causes chromosomiques génétiques et épigénétiques de ces infertilités seront recherchées à partir de biopsies testiculaires pour étudier les cellules germinales présentes dans les tubules séminifères. Ces biopsies testiculaires seront réalisées par hémi-castration chirurgicale sous anesthésie générale par du personnel qualifié et expérimenté,

Respect de la règle des 3R :

Remplacement : le porc est l'espèce cible de projet puisque des retombées pour la filière sont attendues et il n'est pas envisageable de la remplacer par des approches de cultures *in vitro* qui ne sont pas au point pour le moment.

Réduction : nous ne recruterons que les 10 cas les plus intéressants (oligo- ou azoospermies non réversibles et validées après différents prélèvements espacés dans le temps).

Raffinement : les verrats seront hébergés dans des cases de 6 m<sup>2</sup> sur une litière de 30 cm de copeaux avec un accès libre à l'eau et seront alimentés 2 fois par jour. De plus, la douleur liée à la castration sera prise en compte par l'injection d'anti inflammatoire pour compléter l'action de l'analgésique pré anesthésie.

7077. La Fraction vasculaire stromale : un cocktail de cellules souches pour la cicatrisation des plaies chroniques.

Les plaies chroniques sont responsables chez les patients diabétiques et artéritiques d'un handicap et d'une altération de la qualité de vie majeure. Ils représentent un coût de santé important. A l'heure actuelle, les cellules souches hématopoïétiques ont montré des résultats prometteurs dans la cicatrisation de ces plaies, mais la complexité de leur préparation rend cette thérapeutique inutilisable en pratique clinique quotidienne. A l'heure actuelle, il n'y a aucun traitement consensuel de thérapie cellulaire permettant de soigner ces plaies. Ici, nous proposons de tester l'efficacité de la fraction vasculaire stromale (FVS), un véritable concentré de cellules souches obtenu simplement à partir du tissu adipeux humain collecté après lipoaspiration chez un patient sain, sur la plaie chronique chez la souris témoin, diabétique, ischémique et diabétique et ischémique à la fois. Deux cent seize souris *Nude* seront nécessaires à la réalisation de cette étude.

Les souris seront hébergées en cage de type II par 4 durant la période d'acclimatation, puis seule dès lors que des soins ou un pansement sera nécessaire afin d'éviter toute agression d'un animal envers un autre. Chaque cage sera agrémentée de « carfil nesting », de petites bandes de papier kraft recyclé, sans poussière, inoffensif pour le milieu et propre afin d'amener un enrichissement aux souris et les stimuler dans la réalisation de leur propre nid au sein de la cage.

Trois phases d'étude nécessitant chacune 72 souris seront réalisées successivement : 216 au total.

- La première phase est la mesure de la vitesse de cicatrisation et des phénomènes intervenant pour chaque lot de souris étudiées, sans ajout d'autre thérapeutique que les soins habituels de la plaie ou l'injection d'un produit placebo. Quatre lots sont à l'étude : témoin, diabétique, ischémique, diabétique et ischémique. 8 souris par lot sont nécessaire sauf pour les lots de souris diabétiques : 10 souris nécessaires, soit 4 lots par condition et 2 conditions soit 36 x 2 conditions = 72 souris

- La seconde phase consiste en l'étude de la tolérance et l'efficacité sur ces quatre mêmes groupes de la fraction vasculaire stromale selon deux doses :  $10^6$  et  $5 \times 10^5$  cellules. 8 souris par lot sauf pour les lots de souris diabétiques : 10 souris. 4 lots par condition et 2 conditions soit  $36 \times 2$  conditions = 72 souris.

- La troisième phase consiste en l'étude de l'efficacité de l'hyperbarie et l'hypobarie alternée pour la régénération cellulaire comparée à l'hyperbarie seule. 8 souris par lot sauf pour les lots de souris diabétiques : 10 souris. 4 lots par conditions et 2 conditions soit  $36$  souris  $\times 2$  conditions = 72 souris.

Plusieurs dispositions sont prises pour réduire l'effectif de souris nécessaire. 4 zones identiques d'études sont réalisées par souris, permettant d'obtenir quatre fois plus de matériel à l'étude et donc de diminuer le nombre de sujets pour une même puissance statistique. Les études des actions de la thérapie cellulaire et du caisson hypo/hyperbare ont un objectif commun : montrer l'amélioration de la cicatrisation, et sont donc regroupées dans un seul protocole afin d'utiliser le même groupe témoin. Un résultat positif permettrait d'entrevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques à court terme dans la prise en charge des plaies chroniques. En effet, la FVS du tissu adipeux a déjà montré une action durable sur les lésions cutanées de la sclérodermie chez la souris. Un essai clinique est actuellement en cours avec des résultats très prometteurs sur la main des patients sclérodermiques. Un second essai clinique national de grande envergure, mené par notre équipe clinique, est en attente pour transposer les résultats murins à la plaie des patients diabétiques.

7078. Le syndrome du QT long est une maladie rythmique génétique provoquant des morts subites. Des mutations du gène *SCN5A*, qui code le canal sodique Nav1.5, sont à l'origine de ce syndrome dans 15% des cas. Parmi ces mutations, la délétion des acides aminés QKP1507-1509 provoque, en plus d'un syndrome du QT long, l'apparition d'une cardiomyopathie dilatée. Les familles porteuses de cette mutation ont un risque élevé de décès prématuré (adolescents et jeunes adultes). Nous avons montré qu'un modèle murin exprimant la mutation équivalente, la souris *Scn5a+/delQKP*, exprime un phénotype similaire à celui des patients, avec la survenue d'arythmies et la présence d'une cardiomyopathie dilatée conduisant à une mortalité élevée et prématurée. Le syndrome du QT long est généralement traité par l'administration de bêtabloquants, très efficaces dans les formes du syndrome du QT long liées à des mutations des canaux potassiques (85% des cas), mais peu efficaces chez les patients porteurs de mutations sur Nav1.5.

Nous avons montré les effets bénéfiques (suppression des arythmies) d'une administration aiguë de ranolazine ou de GS967, deux inhibiteurs de la composante persistante du courant sodique généré par le canal Nav1.5 muté, chez les souris *Scn5a+/delQKP*. Notre objectif est d'analyser les effets bénéfiques d'une administration chronique de ranolazine (30 mg/kg/jour) ou de GS967 (3 mg/kg/jour) sur les souris *Scn5a+/delQKP*. Notre hypothèse est qu'un traitement chronique des souris préviendrait les arythmies, la dilatation ventriculaire et donc la mort prématurée des animaux. La ranolazine et le GS967 seront comparés à la flécainide (10 mg/kg/jour), un inhibiteur de la composante rapide du courant sodique généré par Nav1.5, utilisé en clinique comme antiarythmique. Nous avons observé que la flécainide, administrée de façon aiguë, permet aussi de prévenir les arythmies. La comparaison des deux molécules (ranolazine ou GS967) avec la flécainide permettra de vérifier si l'insuffisance cardiaque est secondaire aux arythmies ou si le courant sodique persistant induit par la mutation suffit à déclencher les processus de remodelage conduisant à l'insuffisance cardiaque.

Les arythmies étant déjà observés dans les jours qui suivent la naissance, le traitement (ranolazine, GS967, flécainide ou véhicule) sera administré aux mères porteuses et allaitantes, de façon à inhiber le courant généré par la mutation dès le stade embryonnaire. Le traitement des souriceaux sera prolongé jusqu'au sevrage à 3 semaines. La flécainide et la ranolazine, solubles dans l'eau, ont été montrées comme passant la barrière placentaire et dans le lait, sans effet délétère sur les embryons. Le GS967, molécule développée plus récemment, n'a pas encore fait l'objet d'étude pharmacocinétique. Le GS967 est soluble dans un mélange contenant 15% de NMP (N-méthyl-2-pyrrolidone), 10% de solutol et 75% d'eau. La molécule est ensuite diluée au 1/10 dans l'eau pure avant utilisation, les concentrations finales de NMP et de solutol dans la solution administrée étant alors de 1,5% et 1% respectivement. Le solutol est un excipient non toxique, déjà utilisé dans de nombreuses études, notamment en administration intra-veineuse chez le rat ou le lapin. Le NMP est utilisé chez l'Homme comme excipient dans les produits cosmétiques, à des quantités maximales de 5%.

Les souris gestantes et les portées traitées avec la ranolazine constitueront le groupe 1. Les souris gestantes et les portées traitées avec le GS967 constitueront le groupe 2. Les souris gestantes et les portées traitées avec la flécainide constitueront le groupe 3. Le groupe 4 sera constitué des souris traitées avec le placebo (eau).

Un électrocardiogramme de surface (ECG) sera réalisé au moment du sevrage à l'âge de 3 semaines sur l'ensemble des souris *Scn5a+/delQKP*. Après ECG, un lot de 6 souris par groupe (ranolazine, GS967, flécainide et placebo) sera euthanasié et les organes prélevés pour une étude histologique. Les 4 autres lots (de 14 souris chacun) seront utilisés pour étudier l'impact de la ranolazine ou du GS967 sur le développement de l'insuffisance cardiaque et la survie des souris *Scn5a+/delQKP* jusqu'à l'âge de 10 semaines. Un ECG sera enregistré aux âges de 7 et 10 semaines sur les souris de ces quatre lots qui survivront jusqu'à ces âges. A l'âge de 10 semaines, les souris survivantes seront euthanasiées et leurs organes prélevés pour une étude histologique.

Respect de la règle des 3R.

Remplacement : Cette étude est focalisée sur un modèle de pathologie cardiaque qui nécessite une exploration fonctionnelle *in vivo* et un traitement chronique. Seule l'expérimentation animale peut permettre de déterminer si le traitement testé présente un intérêt clinique en prévenant les troubles du rythme et la cardiomyopathie dilatée.

Réduction : Au total, un maximum de 80 souris *Scn5a+/delQKP* sera nécessaire (20 souris par groupe). A ce nombre, s'ajoutent les souris reproductrices (16 femelles et 8 mâles), soit un total de 104 souris. Cette étude s'étalera dans le temps. Au fur et à mesure de l'inclusion des données, des analyses statistiques seront réalisées. Si une différence statistiquement

significative entre les souris traitées à la ranolazine ou au GS967 et celles traitées avec la flecainide et le placebo apparaît avant la fin de l'étude, le nombre de portées sera réduit.

Raffinement : Les souris seront hébergées en cages ventilées enrichies de tunnels pour se camoufler, ou de papier pour réaliser des nids. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque technique. En ce qui concerne l'étude des effets de la ranolazine ou du GS967 sur le développement d'une insuffisance cardiaque et la survie des souris, nous euthanasierons tous les animaux présentant des signes d'insuffisance cardiaque sévère avant leur décès spontané pour éviter leur souffrance. En effet, l'insuffisance cardiaque sévère est facile à déceler en raison de signes cliniques évidents tels que la prostration des animaux, le poil hirsute, l'essoufflement, etc.

7079. L'infarctus du myocarde (mort d'une partie ou de la totalité du muscle cardiaque) est un accident lié à une ischémie (diminution de l'apport sanguin artériel) des vaisseaux irrigant le muscle cardiaque. Il peut être à l'origine d'une défaillance de la fonction cardiaque, appelée insuffisance cardiaque. Selon des données OMS, les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité chez l'homme et parmi celles-ci, les cardiopathies ischémiques sont la première cause de décès. Le traitement actuellement le plus utilisé de l'insuffisance cardiaque chez l'homme consiste à associer différents médicaments. Afin de valider l'efficacité de ces médicaments ainsi que de nouveaux traitements innovants et avant de les tester chez l'homme, il est nécessaire de les évaluer dans un modèle animal pertinent, compte-tenu des nombreux et complexes mécanismes de régulation de la fonction cardiaque qui nécessitent d'observer les effets du traitement sur un organisme entier. Le modèle d'insuffisance cardiaque créé par ischémie temporaire chez le primate non-humain (PNH) est pertinent car il présente d'excellentes similarités avec les mécanismes de cette maladie chez l'homme.

En outre, chez certains patients souffrant d'insuffisance cardiaque, malgré le traitement peut apparaître une décompensation de l'insuffisance cardiaque, critique car potentiellement invalidante voire mortelle. Il est possible d'étudier cette décompensation par un arrêt du traitement administré sur ce même modèle animal.

L'objectif de ce projet est donc double, puisqu'il consiste en 2 procédures exploratoires d'un modèle PNH d'insuffisance cardiaque précédemment autorisé par les autorités réglementaires.

L'objectif de la procédure 1 est l'évaluation de l'efficacité d'un traitement de référence de l'insuffisance cardiaque, utilisé en clinique chez l'homme. Pour cela, un modèle d'insuffisance cardiaque induit par ischémie myocardique sera mis en œuvre sur des singes *cynomolgus*. Il sera effectué par voie endo-vasculaire, pour une invasivité et une douleur postopératoire minimale, sous anesthésie générale volatile et analgésie préventive. Les animaux seront répartis de façon aléatoire dans 2 groupes : un groupe recevant le traitement à évaluer, l'autre groupe recevant le véhicule du traitement, par voie orale quotidienne pendant 4 semaines.

Par souci de réduction, les mêmes animaux seront également mis à profit, dans la procédure 2 du projet, pour déterminer l'effet de l'arrêt du traitement sur la fonction cardiaque. L'arrêt du traitement devrait provoquer une décompensation de l'insuffisance cardiaque, mimant l'aggravation des symptômes et des signes apparaissant chez certains patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique. Si l'arrêt du traitement n'engendre pas la décompensation attendue entre la 5e et la 8e semaine de suivi, la décompensation cardiaque sera induite. Les animaux seront euthanasiés au plus tard à la 9ème semaine, pour prélèvement d'organes en vue d'analyses microscopiques.

Les animaux utilisés proviendront d'un élevage agréé et l'ensemble du projet sera mené en accord avec la réglementation européenne et nationale.

Tout au long du projet, des évaluations cliniques, fonctionnelles et morphologiques de la fonction cardiaque seront menées régulièrement, au moyen de techniques non-invasives (mesures de pression artérielle, ECG, échocardiographie, IRM), par des vétérinaires et des experts. Des marqueurs de l'inflammation, de l'ischémie myocardique et de la fonction rénale seront également évalués grâce à des prises de sang, dans le respect des bonnes pratiques, afin de déterminer l'effet du traitement puis de son arrêt et de caractériser ce modèle translationnel d'insuffisance cardiaque.

Les animaux seront suivis individuellement et très régulièrement tout au long du projet, afin de détecter tout signe clinique anormal et tout signe de douleur et/ou de détresse : observation clinique biquotidienne, évaluation du stress et de la douleur quotidienne, pesée hebdomadaire. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour sortir l'animal de l'étude si des effets attendus ou inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Réduction : ce projet prévoit au maximum 100 animaux sur 5 ans. Ce nombre a été réduit au minimum pour évaluer l'efficacité de différents traitements innovants de l'insuffisance cardiaque et obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme.

Par souci de réduction, les mêmes animaux inclus dans la procédure 1 seront également mis à profit dans la procédure 2 du projet.

Raffinement : les conditions d'hébergement sont conformes à la législation en vigueur et aux recommandations les plus strictes, pour éviter tout stress des animaux. Les animaux seront hébergés par groupes sociaux lorsque possible et bénéficieront d'un programme d'enrichissement, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (« kong », ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter tout stress ou souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel au contact des animaux est formé sous la responsabilité du vétérinaire. Il veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations. Des

entraînements réguliers et progressifs des animaux seront effectués dans la même optique. L'intervention pour la création du modèle sera effectuée par la voie la moins invasive et la moins douloureuse possible (voie endo-vasculaire) par un cardiologue interventionnel expérimenté.

Des points limites précis sont définis pour éviter toute souffrance des animaux et des mesures de réanimation péri-occlusion lors de décompensation cardiaque sont définies.

7080. L'ostéomyélite est une infection bactérienne de l'os et du tissu osseux caractérisé par une réponse inflammatoire aiguë ou chronique menant à une perte osseuse. La bactérie responsable isolée en culture est dans 60% des cas un staphylocoque doré avec un taux de résistance à la méticilline en constante augmentation. Ces infections nécessitent des traitements longs et des actes chirurgicaux afin de retirer les tissus nécrosés. Les options pour le traitement de ces infections sont limitées par des facteurs pharmacocinétiques (comme la pénétration des antibiotiques dans les tissus osseux) et la sensibilité de la bactérie en cause au traitement.

Il apparaît donc nécessaire de trouver de nouvelles alternatives pour faire face à l'augmentation de la résistance des souches de *Staphylococcus aureus* et ainsi d'améliorer la prise en charge des infections ostéo-articulaires.

Parmi les antibiotiques les plus utilisés, la rifampicine, la gentamicine et la daptomycine sont les plus prescrits en cas notamment d'infection à *Staphylococcus aureus*.

Une première étude a permis d'évaluer trois posologies différentes d'un nouvel antibiotique Debio1450 dans un modèle expérimental d'ostéomyélite à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) chez le lapin : les premiers résultats ont montré une activité significative, non dose-dépendante. La suite de cette étude aura donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de deux doses plus faibles de l'antibiotique Debio1450 dans ce même modèle expérimental et de comparer leur activité avec celle de la rifampicine, de la gentamicine et de la daptomycine seuls ou en association. L'association d'antibiotiques peut permettre d'augmenter *in vivo* la bactéricidie, de prévenir l'émergence de mutants résistants et d'élargir le spectre d'activité d'un composé.

Pour cela, 108 lapins femelles néo-zélandais seront utilisés. Une infection bactérienne à SARM sera induite par voie intra-articulaire reproduisant ainsi la pathologie. Les animaux seront répartis dans 9 groupes : animaux contrôles (sans traitement), animaux traités avec Debio1450 (2 posologies différentes), animaux traités avec de la gentamicine, animaux traités avec de la daptomycine, animaux traités avec la rifampicine et trois groupes d'animaux traités en association. Sept jours après infection, les animaux seront euthanasiés et la moelle osseuse et l'os seront prélevés afin de déterminer les charges bactériennes.

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

7081. La finalité de notre travail est le développement d'un produit d'ingénierie tissulaire destiné à la régénération de tissu colorectal permettant de répondre à des besoins cliniques majeurs en chirurgie digestive.

La chirurgie colorectale (après cancers, fistules pelviennes, maladie de Crohn...) nécessite de disposer d'outils pour renforcer les sutures. En effet les « fuites de suture » dites fistules anastomotiques constitue une complication majeure de cette chirurgie à l'origine d'une mortalité importante. L'objectif de ce projet est de tester des « plaques de matériel biologique ou matriceensemencées de cellules » qui facilitent la cicatrisation

Ce travail est une étape avant un projet de remplacement du rectum par ingénierie tissulaire qui associe des cellules issues de l'animal et une matrice biologique acellulaire

Le protocole de recherche soumis est en cohérence avec une première année de recherche qui nous a permis de sélectionner une matrice d'origine biologique à partir d'études *in vivo* (lapins) et *in vitro* dans son aptitude à favoriser la régénération tissulaire colorectale.

Au cours de la 2ème année de travail, cette matrice non cellularisée a été implantée sur 10 porcelets large white au niveau d'un trou réalisé sur le colon de 3x2 cm avec des résultats très encourageants. L'objectif de cette 3ème année est d'évaluer l'apport de la cellularisation de cette matrice sur la cicatrisation du colon et la faisabilité de l'implantation d'une matrice circulaire.

La première partie a été réalisée avec des résultats encourageants notamment sur le plan histologique. Le projet comprend 5 porcelets de 40 kg chez lesquels sera réalisée une résection segmentaire de colon avec mise en place d'une matrice circulaire de chitosane de 3cm de diamètre et 3cm de haut amenant ainsi un remplacement circonférentiel de la paroi colique.

Aucune méthode alternative à l'expérimentation animale ne peut répondre à la question posée.

Le modèle porcine a été choisi sur les arguments suivants :

- la structure anatomique et cellulaire, ainsi que la physiologie de l'animal, sont très proches de l'homme,
- la validité du modèle pour l'étude des fistules coliques ou colorectales, dans sa capacité à mimer la réaction du modèle humain face à la même agression,
- l'isolement et la mise en culture de cellules du tissu adipeux (gras) pour d'autres applications chez le porc, dont les caractéristiques sont semblables à celles rapportées chez l'homme et validées dans notre laboratoire.

Afin de respecter la règle des 3 R et suite aux résultats très homogènes obtenus lors du projet précédent, le nombre d'animaux utilisé sera limité à 5 porcelets. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en nous permettant de mettre en évidence des différences significatives (Réduction). Nous prendrons en charge les douleurs post-opératoires (Raffinement). A ce jour, aucune méthode évitant l'utilisation des animaux n'existe. (Remplacement).

7082. Le sepsis représente la première cause de mortalité chez les patients de réanimation avec un taux de décès compris entre 20 et 50%. Il s'agit d'une infection grave de l'organisme avec une inflammation généralisée associée dans les cas sévères à une ou plusieurs défaillances d'organes et on parle de choc septique lorsque s'ajoute une chute importante de la pression artérielle.

Les faibles doses de corticoïdes tels que l'Hydrocortisone et la Fludrocortisone (FC) peuvent être proposées dans le traitement des chocs septiques sévères. Cependant, la place de la FC dans le traitement du choc septique est actuellement débattue, en partie en raison du manque d'études sur le devenir de ce médicament dans l'organisme et les effets spécifiques de cette molécule chez les malades.

Dans une étude menée récemment sur un modèle de choc septique chez le rat nous avons montré que la FC avait un effet bénéfique sur la pression artérielle et sur la contraction des artères. Parallèlement nous avons observé chez l'homme (aussi bien chez le volontaire sain que chez le malade en choc septique) une grande variabilité des concentrations sanguines de FC lorsqu'on l'administre par voie orale. Une forme intraveineuse pourrait permettre de diminuer cette variabilité liée à l'absorption digestive du produit. Il est donc important de comparer la relation entre les concentrations sanguines et l'effet du traitement lorsqu'on l'utilise par voie orale et par voie intraveineuse.

Cette étude se propose donc de caractériser sur un modèle de choc septique chez le rat l'évolution des concentrations sanguines de FC (administrée par voie orale et intraveineuse) en fonction du temps, et ses effets sur la pression artérielle, la fréquence cardiaque et des marqueurs biologiques de l'inflammation.

Deux doses uniques de FC ou un placebo seront testés par voie orale et par voie intraveineuse sur 6 groupes de rats sains et 6 groupes de rats en choc septique (12 animaux par groupe, avec un total de 144 rats). Afin d'obtenir les 144 animaux évaluable sur l'ensemble des critères étudiés, 300 animaux sont prévus pour tenir compte des éventuelles pertes liées au choc septique (environ 30% de mortalité). Après chaque administration du traitement, des prélèvements sanguins successifs à différents temps seront réalisés. Ces prélèvements serviront aux mesures des concentrations sanguines de FC et des marqueurs biologiques de l'inflammation. En même temps que ces prélèvements, des mesures de pression artérielle et de fréquence cardiaque seront effectuées.

Le modèle de rat utilisé dans cette étude est un modèle courant de choc septique chez le petit animal maîtrisé dans notre laboratoire. Cette étude est menée dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : la forme intraveineuse de la FC n'étant pas disponible actuellement chez l'homme, le recours aux animaux pour tester cette voie d'administration est donc un préalable indispensable.

Réduction : le nombre d'animaux a été calculé comme étant le nombre minimum nécessaire pour obtenir des résultats significatifs statistiquement.

Raffinement : le protocole de l'étude a été élaboré de façon à limiter les interventions sur l'animal (mise en place d'un cathéter pour les prélèvements, limiter le nombre et le volume des prélèvements pour chaque rat). Enfin, toutes les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie.

Cette étude doit nous permettre de comparer l'évolution des concentrations plasmatiques de FC par voie orale ou intraveineuse en fonction du temps et de quantifier plus précisément la relation concentration-effet de cette molécule chez le rat en choc septique.

7083. L'introduction des nanomédicaments en médecine (où le médicament est incorporé dans un matériau de taille nanométrique pour le transporter au site d'action) a révolutionné la formulation pharmaceutique en permettant l'émergence de nouveaux traitements avec une spécificité et efficacité accrues.

Bien que des premiers nanomédicaments soient déjà sur le marché, ils sont peu nombreux car d'importants verrous technologiques demeurent tels que leur faible pouvoir de charge du médicament et sa libération non contrôlée, ou encore une toxicité importante.

Ce projet de recherche s'encadre dans un projet plus vaste pour développer des nouveaux nanomédicaments plus sûrs sur le plan toxicologique et plus efficaces sur le plan pharmacologique. En effet, un nouveau type de nanomatériaux à base de carboxylates de fer poreux a été récemment proposé, dont les capacités de charge des principes actifs antitumoraux se sont révélées exceptionnelles avec des libérations progressives, et en prime des propriétés en imagerie médicale. Administrés à des doses très importantes, aucun signe de toxicité n'a été détecté. En conséquence, ces nanomédicaments semblent être une alternative très prometteuse pour la biomédecine.

L'évaluation de l'efficacité anticancéreuse de ces nanomédicaments doit être précédée par l'étude de la pharmacocinétique et la bio-distribution, c'est à dire, du temps de circulation du vecteur et du médicament encapsulé dans le sang et de leur profil d'accumulation dans les différents organes après l'administration.

L'objectif de ce projet est de déterminer la pharmacocinétique et la bio-distribution des nanoparticules à base de trimesate de fer (MIL-100(Fe)), avec différentes propriétés de surface, encapsulant la gemcitabine monophosphate, afin de mieux comprendre l'interaction entre le nanovecteur et l'organisme.



Pour cela, 7 types de nanoparticules de MIL-100(Fe), avec des modifications de surface différentes, vides et avec la gemcitabine monophosphate encapsulée à l'intérieur, seront administrées par la voie intraveineuse. À des temps différents, la concentration des nanoparticules et de la gemcitabine monophosphate sera quantifiée dans le sang et dans les organes.

Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

La pharmacocinétique et la bio-distribution sont le résultat d'une somme de processus physiopathologiques complexes découlant d'interactions vasculaires, tissulaires, cellulaires et moléculaires. Ainsi pour améliorer la compréhension de ces multiples processus et pouvoir développer de nouvelles thérapies, le recours à l'animal est indispensable. Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* ou *in silico* capable de reproduire la complexité de ces processus.

Une planification statistique a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude. Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre des animaux. Pour la réalisation de cette étude le nombre total d'animaux est de 1044 souris.

De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress.

7084. La maladie cardio-vasculaire est un problème de santé publique majeur, elle représente la seconde cause de mortalité et c'est la cause principale de décès des personnes souffrant d'insuffisance rénale. La réaction de carbamylation des protéines est impliquée dans le développement de la maladie cardio-vasculaire, et ce phénomène est amplifié au cours de l'insuffisance rénale chronique. Il a été montré que l'administration d'acides aminés par voie sanguine pouvait réduire la carbamylation des protéines plasmatiques. Notre objectif est de déterminer si l'administration par voie intrapéritonéale d'acides aminés peut prévenir la carbamylation tissulaire.

Nous utiliserons un modèle de souris dans laquelle la carbamylation sera amplifiée soit par création d'une insuffisance rénale chronique par néphrectomie subtotalaire, soit par administration de cyanate dans l'eau de boisson. Nous testerons l'efficacité de l'administration d'une solution d'acides aminés par voie intrapéritonéale sur la prévention de la carbamylation des protéines matricielles tissulaires (collagène et élastine).

Un total de 60 souris sera utilisé. Le nombre d'animaux est réduit au maximum et est déterminé par la nécessité d'obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique. Les tests statistiques choisis sont adaptés à de petits effectifs. Les animaux seront hébergés selon les conditions légales dans des cages enrichies (rouleaux de carton rigide dans les cages). L'injection de la solution d'acides aminés par voie intrapéritonéale sera réalisée sous courte anesthésie gazeuse. La solution d'acides aminés injectée est utilisée chez l'homme dans les mêmes conditions et n'a pas d'effets secondaires douloureux. Des points limites seront déterminés et seront recherchés quotidiennement par le personnel de l'animalerie, qui préviendra le chercheur le jour même pour décider de la conduite à tenir. Les prélèvements (sanguins, histologiques) ne se feront qu'au moment de l'euthanasie de l'animal profondément anesthésié.

7085. La trachéobronchite infectieuse, plus communément appelée toux de chenil, est une maladie contagieuse qui atteint l'appareil respiratoire du chien. Les chiens vivant en communauté ou en collectivité sont particulièrement exposés au risque infectieux. L'animal se contamine principalement lors d'activités considérées comme collectives, telles que les sorties dans les jardins publics, lors de parties de chasse, lors d'une promenade dans la rue, en élevage, en exposition, ou encore dans des centres de dressage.

Ainsi, tous les chiens susceptibles d'entrer en contact avec d'autres chiens sont potentiellement exposés. Chez les chiots, les animaux affaiblis ou très vieux, la toux de chenil peut être plus grave que chez l'adulte, entraînant des signes cliniques graves. L'agent majeur de la toux de chenil est une bactérie, *Bordetella bronchiseptica*.

Cette maladie se transmet par les aérosols expulsés lors de toux, par l'écoulement nasal ou par le contact rapproché dit « nez-à-nez ». La maladie se développe rapidement et peut durer plusieurs semaines.

Les symptômes observés incluent une toux caractéristique d'intensité et de durée variables en fonction de chaque chien et de possibles surinfections. La toux est exacerbée lorsque l'animal est excité ou a fait de l'exercice. Les animaux présentent souvent des rhinites et ont de la fièvre. Dans de rares cas, cette toux peut évoluer en pneumonie. Lors d'une épidémie, un grand nombre de chiens est généralement infecté, jusqu'à 80% dans les chenils. Les symptômes commencent 3 à 5 jours après l'infection et peuvent durer 3 semaines. Le traitement est long et coûteux. Il associe des antibiotiques pour éliminer la bactérie, des anti-inflammatoires et des antitussifs.

Il existe des vaccins contre la toux de chenil. Ces vaccins présentent une efficacité variable en fonction de leur formulation et de leur voie d'administration. La meilleure protection clinique semble être obtenue avec des vaccins vivants atténués administrés par voie intra-nasale. Il a cependant été montré que suite à la vaccination, les animaux excrètent dans le milieu extérieur la souche vaccinale pendant 2 à 3 semaines.

L'objectif de notre étude est de tester l'efficacité clinique d'un nouveau vaccin injectable inerte (et donc sans risque de dissémination dans l'environnement) issu de technologies innovantes contre la toux de chenil.

Pour réaliser cette étude, nous allons travailler directement sur l'animal cible, le chien. Il est en effet nécessaire de valider l'efficacité clinique directement sur l'espèce concernée. Des preuves d'efficacité ont déjà été obtenues dans des modèles rongeurs, le chien n'est donc utilisé que pour les dernières étapes de validation. Nous ferons appel à un total de 35 chiens

provenant d'un élevage agréé. Le nombre d'animaux utilisé est le nombre minimal permettant de valider l'efficacité du vaccin. Les animaux seront hébergés en groupe, dans un environnement enrichi (jouets, zone de jeu) adapté à leur développement social. Ils seront au contact de l'homme 2 fois par jour, pour des séances de sociabilisation et d'éducation. Après la vaccination et l'infection, les animaux seront suivis par un vétérinaire et un traitement sera mis en place immédiatement si l'état général de l'animal le nécessite. Les animaux seront proposés à l'adoption à la fin de la phase expérimentale.

7086. De nos jours, l'idée que l'état de santé chez l'adulte est déterminé par des événements périnataux est de plus en plus grandissante. Une fenêtre dite « critique » apparaissant très tôt dans la vie apparaît sensible à de nombreux facteurs environnementaux, en particulier à l'exposition à des substances chimiques qui contribueraient à augmenter le risque de pathologies chez l'adulte. Parmi ces facteurs, le Bisphénol A (BPA), un œstrogène synthétique utilisé comme monomère pour la confection des plastiques polycarbonates et résines époxy des emballages alimentaires, dont les boîtes de conserve. L'exposition humaine est attestée par la présence de BPA dans les urines et le sang.

Le papier à impression thermique est également recouvert de Bisphénol A (BPA, 20mg/g papier) utilisé comme révélateur, ou par l'un de ses substituts (BPS ou BPF), trois composés classés comme perturbateurs endocriniens (PE). Dans son évaluation des risques pour la santé humaine, associés au BPA (2013), l'Anses a conclu que l'exposition cutanée aux tickets à base de BPA augmentait le risque de perturbation endocrinienne pour l'enfant à naître de la femme enceinte, tout en soulignant le besoin de mieux caractériser les différentes voies d'exposition. Selon l'exemple du BPA, le BPS et le BPF peuvent être directement absorbés dans la circulation sanguine par voie transcutanée, ou sublinguale après un contact « main bouche ». Dans ces conditions, ces composés ne sont pas métabolisés par un premier passage hépatique, et restent biologiquement actifs pendant une période prolongée en comparaison d'une exposition orodigestive par l'alimentation seule.

Le présent projet propose de comparer, pour chaque bisphénol, l'effet d'une administration par gavage (méthode par défaut utilisée pour tester les dangers des substances chimiques ingérées) en comparaison à l'administration sous-cutanée (passage lent dans la circulation générale mimant une exposition transcutanée) sur une fonction cible du BPA préalablement identifiée : la réponse immunitaire systémique et locale.

A ce jour, nous ne disposons d'aucune étude permettant d'apprécier le potentiel hormono-mimétique de ces nouvelles substances dans l'intestin. Dans ce but, nous proposons de tester l'activité estrogéno-mimétique (étude dose-réponse), du bisphénol S (BPS), du BPF, et de 4 autres molécules de la classe des bisphénols (nommés ci-après BP1 à BP4, définis au cours du projet selon utilisation sur le marché) en comparaison du BPA et de l'œstradiol (pris comme molécules de référence) chez le nouveau-né de souris, sur des paramètres de la fonction de barrière intestinale sensibles à une exposition orale à l'œstradiol. Les doses efficaces (ED50) pour chaque produit démontrés hormono-actifs seront ensuite administrées chez la souris gestante et/ou allaitante pour étudier l'impact d'une exposition périnatale (voie orale et cutanée) sur la réponse immunitaire dans la descendance jeune (période péri-pubère) et à l'âge adulte. Aucun modèle d'étude in-vitro ne peut rendre compte de la complexité des processus physiologiques et métaboliques mis en jeu dans le phénomène que nous étudions (phases de développement dans la transition fœtus/nouveau-né/puberté) qui sont susceptibles d'être perturbées par l'exposition pré- et postnatale aux bisphénols de différentes natures. Seul le recours à l'animal vivant peut donc rendre compte de cette complexité. C'est pourquoi nous ferons appel à un modèle animal de référence pour les études sur les relations mère-fœtus : la souris. Le nombre d'animaux utilisé dans le projet est de 1215. Les souris seront hébergées dans des conditions optimales dans des locaux d'animalerie répondant aux normes réglementaires et la mise en place d'un enrichissement des cages des femelles pendant la gestation (ajout de sopaline...) afin d'assurer leur bien-être et état de santé. De plus, le nombre d'animaux par groupe expérimental est réfléchi pour être le plus réduit possible, tout en préservant la capacité d'interprétation des résultats.

7087. L'expérimentation animale de ce projet est effectuée dans le cadre de la recherche et le développement d'anticorps monoclonaux utilisés dans le domaine de l'oncologie et de la recherche fondamentale.

Les gènes ING1 et ING2 ont été décrits comme étant des gènes suppresseurs de tumeur puisqu'ils sont impliqués dans des voies de suppression des tumeurs telles que la mort cellulaire. Ils ont une très grande homologie ce qui suggère leur implication dans des fonctions proches ou redondantes. Ces gènes sont rarement mutés dans les tumeurs mais la diminution ou perte de leur expression est un événement fréquent dans de nombreux cancers. Actuellement le statut des ING dans différents types tumoraux est bien défini. Cependant, il n'y a aucune étude concernant leur implication dans les Lymphomes B. De plus, la suppression du gène ING1 chez la souris conduit au développement spontané de lymphomes B présentant une haute incidence. L'objectif de notre étude est donc de déterminer le statut d'ING1 et ING2 dans ces lymphomes.

Actuellement, nous ne disposons pas d'anticorps anti-ING2 nous permettant de mener à bien cette étude. En effet, des anticorps dirigés contre ING2 sont disponibles dans le marché mais ils ne sont pas efficaces. La production de cet anticorps permettra d'analyser l'expression d'ING2 au niveau protéique et immunohistochimique. Ils devront donc être utilisables dans différents types d'expériences (Western Blot, Immunohistochimie, Immunofluorescence et immunoprécipitation). Plus particulièrement, l'anticorps anti-ING2 permettra :

1-de déterminer le statut d'ING2 dans le lymphome B,

2-d'un point de vue fondamental, cet outil sera ensuite indispensable pour l'analyse fonctionnelle de cette protéine dans différents processus cellulaires.

Ces expériences devraient nous permettre de déterminer si le gène ING2 joue un rôle dans la lymphomagenèse B et s'il peut avoir un intérêt comme critère pronostic. De plus, le lymphome B folliculaire a une évolution lente avec peu ou pas de symptôme, cet anticorps pourrait donc avoir un intérêt diagnostique. Il représente donc un outil important et indispensable à la progression de ce projet de recherche.

Pour ce projet, le nombre maximal d'animaux prévu est de 16 rats afin de respecter au mieux la règle des 3R :

Remplacer : Il n'existe pas de méthodes alternatives. De plus, l'obtention de lignées cellulaires a pour but d'éviter l'immunisation d'un grand nombre d'animaux utilisés pour produire des sérums.

Réduire : Cette procédure d'obtention d'anticorps monoclonaux est reconnue comme la plus performante, et le nombre de rat nécessaire est limité à deux lots de 4 animaux par type d'antigène, et à deux voies d'immunisation.

Raffiner : L'état de santé des animaux est contrôlé après chaque injection par le suivi des poids pendant quelques jours. En cas de souffrance modérée, l'injection de morphine est prévue dans les protocoles. Enfin, pour chaque projet d'immunisation, les conditions d'immunisation et les réponses observées sont consignées dans un fichier. Une analyse rétrospective des expériences réalisées sera effectuée dans le but d'optimiser le nombre d'animaux nécessaires pour ce type de projet.

7088. La consommation de viande est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques ont été consolidées par des études en laboratoire à l'aide de modèles animaux et cellulaires. Ces études sur l'animal ont permis de déterminer les mécanismes impliqués : des travaux précédents ont permis de démontrer que le fer sous forme hémique était responsable de cet effet en catalysant un fort stress oxydant dans la lumière intestinale. L'utilisation de cellules en culture a permis de montrer que les produits d'oxydation des graisses, comme le 4-hydroxynonéal que l'on trouve au niveau de la cavité du tube digestif lors de ce stress oxydant étaient plus toxiques pour les cellules saines que pour les cellules portant déjà une mutation, favorisant ainsi la prolifération des cellules mutées et de fait, l'apparition du cancer. L'utilisation de cellules en culture a permis de préciser les mécanismes moléculaires ; cependant, les études *in vitro* ne permettent pas d'évaluer l'ensemble des répercussions induites par des régimes complexes au niveau de l'épithélium colique, nécessitant de fait, l'utilisation d'animaux. Néanmoins, l'expérimentation *in vitro* et l'utilisation de tests statistiques adaptés permettent de réduire le nombre d'hypothèses et ainsi le nombre d'animaux. Ainsi, pour respecter la règle des 3R, le nombre de rat est réduit au maximum sans toutefois impacter la qualité statistique de nos résultats, le raffinement est inclut avant (protocoles limitant les interventions sur les animaux), pendant (durée réduite au maximum en travaillant sur des stades précoces du cancer) et après (exploitation optimale des données). Le facteur de transcription Nrf2 joue un rôle majeur dans la réponse cellulaire au stress oxydant et est une plaque tournante des mécanismes de défense cellulaires. Cependant son rôle dans la cancérogenèse est ambigu : certains travaux laissent penser que pour les stades précoces du cancer, l'activation de Nrf2 serait protectrice alors que pour les stades plus avancés, son activation serait promotrice du cancer. Une équipe américaine vient de créer une souche de rats, pour laquelle le gène Nrf2 a été invalidé. Ce nouveau modèle permettra de déterminer *in vivo* les effets de la délétion de la protéine NRF2, en particulier sur les conséquences d'une alimentation riche en produit pro-oxydants inductrice du cancer colorectal et sur les effets de molécules alimentaires protectrices visant à prévenir ce cancer. Ce projet vise à caractériser les effets de l'absence de la protéine NRF2 dont les propriétés anti-inflammatoires et proto-oncogéniques sont connus, dans l'évolution du cancer colorectal associé à la consommation de viande rouge ou de produits issus de la peroxydation lipidique. Nous utiliserons un maximum de 708 rats mâles, invalidés pour le gène Nrf2 (hétérozygotes Nrf2<sup>+/-</sup> et homozygotes Nrf2<sup>-/-</sup>) et leurs contrôles sauvages. Les animaux seront hébergés dans une animalerie standard leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être. Ils seront soumis à des régimes alimentaires riches en viande et enrichis en antioxydants. L'utilisation de ce modèle animal est indispensable (remplacement impossible) car nous travaillons avec un aliment promoteur de la cancérogenèse (expérimentation chez l'Homme impossible) et aucun modèle cellulaire ne permet de modéliser le lien aliment/cancer. Le but de ces recherches est de proposer des stratégies de prévention du cancer du côlon.

7089. Les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) sont définies comme des cellules caractérisées par l'expression de marqueurs phénotypiques non spécifiques et leur potentiel de différenciation en cellules de la voie mésodermique. Les sources disponibles de cellules stromales mésenchymateuses sont multiples, incluant les tissus fœtaux et les tissus adultes tels que la moelle osseuse et le tissu adipeux. L'intérêt de leur utilisation chez l'homme est en cours d'évaluation dans des pathologies dys-immunitaires comme la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD : Graft versus Host Disease), mais aussi dans les pathologies inflammatoires comme l'infarctus du myocarde, le diabète ou des affections neurodégénératives. Les CSM ont une action immunosuppressive sur le système immunitaire qui a été démontrée dans certains modèles animaux. Les mécanismes pertinents pour leur efficacité thérapeutique ne sont pas encore bien définis. Pour cela, nous souhaitons étudier l'effet immunomodulateur des CSM et chercher un mécanisme responsable de cet effet.

Notre précédent projet nous a permis de mettre en place et de caractériser un modèle murin portant la GvHD. L'objectif de ce nouveau projet est de valider *in vivo*, sur ce modèle de GvHD préalablement établi, l'efficacité thérapeutique de différents types de CSM et leurs interactions avec les cellules immunitaires humaines dans les organes cibles de l'animal. La conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement est appliquée :

- Remplacement : en biologie immunologique, il est impossible de récapituler l'ensemble des événements conduisant la réaction immunitaire dans un système cellulaire. Plusieurs processus régissant les interactions immunitaires ne sont pas analysables *in vitro*. Il est donc nécessaire d'établir si les CSM sont efficaces dans le contexte de l'animal entier portant une maladie. De plus, la validation de résultats obtenus *in vitro* sur un ou plusieurs modèles animaux est indispensable en vue d'une application clinique. La souris est un petit mammifère et possède donc de nombreuses caractéristiques physiopathologiques communes avec l'homme, indispensables pour l'extrapolation des résultats. Nous avons choisi d'utiliser des souris profondément immunodéficientes pour favoriser la prise de xéngreffe de cellules immunitaires humaines.

- Réduction : Le choix des conditions expérimentales est fixé en lien avec les questions scientifiques du projet et les principes de réduction. Différents paramètres sont pris en compte tels que les types de greffon humain, les types et les doses de CSM. Les procédures expérimentales sont rigoureusement planifiées afin de n'utiliser que le nombre d'animaux strictement nécessaire. Pour atteindre les objectifs scientifiques du projet, un nombre de 270 souris sera utilisé auxquelles s'ajoutent 40 souris reproductrices.

- Raffinement : Les points limites sont établis de façon à détecter le plus précocement possible les signes de souffrance des animaux en fonction de l'objectif de l'expérimentation. Ceux-ci sont basés sur les symptômes cliniques de la GvHD adaptés à la souris. Les animaux recevront une anesthésie et/ou analgésie adaptée à chaque procédure expérimentale.

7090. Le syndrome de l'intestin irritable (SII) est une pathologie intestinale chronique, multifactorielle impliquant des facteurs génétiques, environnementaux et nutritionnels, qui se caractérise notamment par une augmentation de la perméabilité intestinale et une hypersensibilité viscérale. L'occurrence d'événements adverses en période périnatale est un facteur de risque important dans l'épidémiologie du SII. Le but de ce projet de recherche est d'étudier la réponse immunitaire chez le nouveau-né et la sensibilité viscérale chez l'adulte dans 3 modèles de fragilisation du nouveau-né chez la souris : le stress de séparation maternelle (SSM) ; une exposition maternelle à un xénobiotique : le Bisphénol A (BPA) ; et une infection néonatale parasitaire à *Cryptosporidium parvum* (CP). Le SSM ou une infection avec le parasite intestinal CP en période néonatale chez les rongeurs, sont des modèles expérimentaux connus pour induire chez les adultes des symptômes similaires au SII que sont l'hypersensibilité viscérale et l'augmentation de la perméabilité intestinale ; cependant la réponse immunitaire chez ces animaux n'est pas décrite chez le nouveau-né. De plus, il serait intéressant d'étudier le rôle des contaminants alimentaires, notamment du xénobiotique BPA comme facteur de risque dans le SII. En effet, le BPA est capable d'altérer la réponse immunitaire systémique et intestinale, et pourrait avoir des conséquences sur la physiologie digestive.

Les objectifs de ce projet de recherche sont :

- de caractériser si et comment des événements adverses en période périnatale (SSM, BPA ou infection à CP) ont des conséquences à long terme sur la physiologie digestive notamment la sensibilité viscérale chez l'animal âgé de 50 jours (J50).

- identifier des marqueurs communs aux trois modèles prédictifs de la symptomatologie du SII chez les jeunes âgés de 7 et 15 jours (J7 et J15).

Ce projet de recherche a pour but d'analyser différents paramètres physiologiques (la réponse immunitaire, la sensibilité viscérale) et nécessite donc de travailler sur l'animal vivant, aucun substitut *in vitro* n'est envisageable. Toutefois, malgré les 3 modèles à tester (BPA, CP et SSM), l'utilisation d'outils statistiques appropriés va nous permettre de minimiser le nombre d'animaux à utiliser tout en permettant d'obtenir des résultats concluants. Sur les 5 années du projet un nombre total de 1620 animaux sera utilisé. Ces animaux seront hébergés dans des locaux d'animalerie standardisés, dotés des équipements adaptés leur assurant les meilleures conditions de bien-être et de maintien en bonne santé.

7091. Le projet a pour objectif l'évaluation de traitements mini-invasifs sur un modèle de tumeur VX2 chez le lapin. Différentes études seront réalisées selon le type de traitement testé et selon les objectifs scientifiques (performances, tolérance, efficacité).

Notre équipe travaille dans le domaine de l'oncologie et des thérapies innovantes dites mini-invasives des tumeurs. Ces thérapies peuvent être des traitements chirurgicaux par des techniques percutanées, des traitements de radiologie interventionnelle avec guidage en temps réel par radioscopie (embolisation, ablation) ou des traitements pharmacologiques par des thérapies ciblées.

L'utilisation du VX2 chez le lapin comme modèle de tumeur a été développée dans les années 50. Le modèle présente l'avantage d'être reproductible, facilement implantable, à croissance rapide et transplantable dans de nombreux organes. De plus, contrairement aux rongeurs, la taille du lapin permet l'utilisation des mêmes appareillages que chez l'homme. Le VX2 est aujourd'hui le modèle tumoral préclinique le plus couramment utilisé en radiologie interventionnelle.

Le projet décrit l'implantation des cellules tumorales VX2 dans le foie de l'animal, le contrôle du développement des tumeurs et les procédures d'interventions classiquement utilisées pour leur traitement. On estime qu'un total de 675 lapins sera utilisé pour les 5 années de la demande d'autorisation de projet.

Principe des 3R :

• Remplacement : La mise au point, l'évaluation et l'optimisation des traitements anticancéreux nécessitent l'utilisation d'un système *in vivo* reproduisant les conditions pratiques cliniques : conditions d'anesthésie, anatomie et physiologie, matériel utilisé, biologie tumorale pour évaluer la réponse au traitement.

En parallèle, des méthodes alternatives de culture de cellules VX2 seront utilisées pour des tests de prolifération/viabilité sur de plus larges gammes d'agents thérapeutiques (screening) ou pour évaluer les mécanismes moléculaires des traitements ensuite testés *in vivo* (microarray, RT-PCR...).

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude est estimé d'après l'expérience de notre établissement sur le nombre d'individus nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente, classiquement compris entre 4 et 10 animaux par groupe d'étude.

- Raffinement : 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.

7092. La simulation chirurgicale répond à un impératif éthique : « jamais la première fois sur le patient ».

Cet apprentissage concerne des médecins en fin de formation ou des chirurgiens confirmés qui souhaitent acquérir d'autres techniques chirurgicales. L'apprentissage sur le modèle porcin est celui qui procure le plus de similitudes avec la chirurgie chez l'Homme. Cette simulation est indispensable avant de pratiquer soi-même une intervention chirurgicale sur un patient.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Cette formation par simulation "*in vivo*" est indispensable avant de pratiquer soi-même un geste sur un patient. Plusieurs procédés de simulation chirurgicale ont déjà été proposés (modèles inertes, simulateurs) mais l'absence de saignement ne permet pas une simulation réaliste.

(Réduire) Le nombre d'animaux est évalué en tenant compte du nombre de sessions de formation prévisibles, répondant à la demande et fonction du nombre d'inscrits. En comptant 10 sessions de 2 animaux par an, il faudra donc 100 animaux pour la durée du projet sur 5 ans.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Aucun animal ne sera réveillé, l'euthanasie étant réalisée sous anesthésie générale.

Le personnel impliqué dans le projet possède toutes les compétences nécessaires, d'un point de vue technique notamment puisqu'il s'agit de chirurgiens confirmés habilités à l'expérimentation animale ("Conception et réalisation des procédures expérimentales"), et qui seront assistés par une personne du Plateau Technique ayant suivi un module de formation complémentaire pour la chirurgie expérimentale chez le porc.

7093. Le tissu osseux est un site particulier pour le développement tumoral. En effet, qu'il s'agisse de tumeurs primitives ou métastatiques, l'os et les différents types de cellules qui y résident offre une niche pour les cellules tumorales favorisant leur survie et la résistance aux traitements. Nous nous intéressons notamment au développement des tumeurs primaires osseuses qui sont le plus souvent des tumeurs pédiatriques. Malgré les progrès de la chirurgie et des chimiothérapies, le taux de survie reste autour de 70% quand la tumeur est locale mais tombe à 20% chez les très nombreux patients développant des métastases. Pour mieux soigner ces cancers il faut comprendre les processus de dissémination, de résistance et de récurrences.

Le concept de cellules souches cancéreuses prédit l'existence au sein des tumeurs de cellules ayant des capacités particulières de prolifération, de résistance aux traitements et de migration hors de la tumeur. Ces cellules sont très dépendantes de leur environnement. Les cellules souches ont été mises en évidence dans de nombreux types de cancers mais sont encore trop mal caractérisées pour envisager un ciblage spécifique. Pour atteindre cet objectif, il faut tout d'abord identifier des marqueurs fonctionnels permettant de repérer et d'étudier le comportement des cellules souches cancéreuses dans les tissus hôtes. Nous proposons d'utiliser des modèles de tumeurs osseuses *in vivo* parce qu'il est impossible de reproduire *in vitro* les interactions cellulaires et matricielles nombreuses et complexes qui constituent la niche réelle des cellules souche cancéreuses. Notre objectif est d'induire des tumeurs osseuses en injectant des cellules tumorales directement dans un os long. Selon la quantité de cellules injectées nous pouvons soit obtenir un développement tumoral rapide en 4-6 semaines, soit induire une maladie résiduelle qui reste asymptomatique pendant plusieurs mois. Nous attendons de ces expériences de mieux comprendre les interactions entre le microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses, d'avoir une vision dynamique de l'évolution du phénotype de cellule souche au sein des tumeurs osseuses et de tester la pertinence de certaines cibles thérapeutiques sur cette évolution.

Les mesures suivantes ont été et seront prises pour respecter la règle des 3R : Nos hypothèses sont basées sur de nombreux travaux préalables *in vitro* dans des cultures cellulaires. Nous avons optimisé les analyses effectuées ex-vivo pour utiliser le minimum d'animaux. Le programme s'effectuera étape par étape, avec des évaluations constantes. Le nombre d'animaux sera adapté en conséquence. Nous pensons utiliser au maximum 676 souris sur 5 ans pour l'ensemble de ce programme.

Les procédures d'injection seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie. Les animaux seront suivis quotidiennement les 3 jours suivant l'injection, puis 3 fois par semaine. Tout signe de souffrance entrainera l'injection d'analgésique puis une euthanasie compassionnelle si l'état ne s'améliore pas. Des points limite seront établis à l'avance. Nous avons acquis une grande expérience du modèle de tumeurs osseuses chez la souris. Le geste d'injection est bien maîtrisé et n'entraîne pas de lésion invalidante. Les animaux seront euthanasiés avant que la tumeur qui se développe n'entraîne par elle-même une altération des conditions de vie des animaux (difficultés à se déplacer ou à atteindre la nourriture).

7094. La protéine Tau est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives, la plus connue étant la maladie d'Alzheimer. Dans ces maladies, la protéine s'agrège anormalement et induit la mort des cellules du cerveau, les neurones. Les patients souffrent de problèmes de mémoire. Ce projet vise à modéliser cette maladie chez la souris car il n'existe pas de possibilité de remplacement pour l'étude de la mémoire.

Pour ce faire, nous injecterons 3 doses différentes de la protéine Tau modifiée, dans une partie du cerveau responsable de la mémoire spatiale et impliquée dans la maladie d'Alzheimer, l'hippocampe.

La chirurgie est effectuée par du personnel compétent, dans des conditions aseptiques et sous anesthésie générale (raffinement). De plus les animaux suivent un traitement anti inflammatoire avant et après la procédure (raffinement). Après un temps de récupération, les animaux seront soumis à deux tests comportementaux visant à évaluer leur capacité de mémoire. Afin de réduire le nombre d'animaux, mais de toujours pouvoir évaluer la progression des déficits comportementaux, nous utiliserons les mêmes animaux à 15, 30 et 60 jours après l'injection cérébrale (réduction).

Les deux tests de mémoire sont le test de la reconnaissance d'objet et le test de mémoire topographique.

Test de mémoire topographique : Ce test utilise une boîte expérimentale comprenant deux compartiments de forme et d'aspect modulables par addition d'inserts. Les deux compartiments sont connectés par un couloir. Le principe du test est le suivant : L'animal est placé pendant 5 minutes dans la boîte, mais seulement un compartiment est accessible (phase d'acquisition). L'animal est ensuite replacé dans sa cage. Après 30 minutes, l'animal est replacé dans la boîte (phase de restitution) alors que les deux compartiments sont accessibles. Si l'animal se rappelle du compartiment visité lors de la phase d'acquisition, il explorera le nouveau compartiment. Le temps passé par l'animal en exploration active dans chaque compartiment est mesuré afin d'établir une mesure de la mémoire topographique.

Pour le test de reconnaissance d'objet le principe est similaire au test précédent sauf que l'animal est d'abord mis en présence de deux objets identiques pendant la phase d'acquisition, puis un des objets est remplacé par un nouvel objet, non vu auparavant, lors de la phase de restitution. Ces deux tests évaluent deux types de mémoire bien distincts et modulés par deux zones distinctes du cerveau.

Les animaux seront soumis au test de la mémoire topographique à J+15, J+30 et J+60 après l'injection intra-cérébrale, et au test de reconnaissance d'objet à J+16, J+31 et J+61.

Nous utiliserons 48 souris *C57BL6J* femelles, réparties en 4 groupes (3 doses de protéine Tau et un groupe contrôle injecté avec du serum physiologique couramment utilisé dans la recherche sur le cerveau), auxquelles nous ajouterons 3 souris afin de palier à des problèmes lors de la chirurgie et assurant ainsi le nombre minimum d'animaux nécessaire (réduction), soit un total de 51 souris.

Les animaux sont traités par un anti-inflammatoire ayant aussi des propriétés analgésiques, avant et après la chirurgie stéréotaxique (raffinement) afin de minimiser la douleur. Ainsi au réveil suivant la chirurgie, les animaux ne sont pas dissociables d'une souris normale n'ayant pas subi de chirurgie (raffinement) ; cela est nécessaire pour tester la mémoire, car un animal souffrant ou stressé ne peut effectuer ces tests.

Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal (perte de poids, stress, signes de souffrance, prostration) survient, l'animal sera euthanasié immédiatement.

Tous les animaux seront mis à mort 61 jours après l'injection cérébrale du peptide Tau, les cerveaux seront prélevés afin de mesurer différents paramètres des cellules du cerveau et ainsi de les comparer avec la pathologie humaine.

7095. Le diabète est un trouble du métabolisme caractérisé par une hyperglycémie chronique (taux de glucose dans le sang trop élevé) lié à une déficience soit de la sécrétion de l'insuline, soit de l'action de l'insuline, soit les deux. Il existe différents types de diabète.

Le diabète de type 2 est la forme la plus fréquente du diabète (plus de 92 % des cas de diabète traité de l'adulte). Il est caractérisé par une résistance à l'insuline, ce qui signifie que cette hormone nécessaire à la consommation des sucres comme source d'énergie par les organes et tissus est inefficace, et aussi caractérisé par une carence de sécrétion d'insuline ; l'une ou l'autre de ces deux caractéristiques peuvent être présentes. Cette forme de diabète survient essentiellement chez les adultes d'âge mûr mais peut également survenir à un âge plus jeune, voire même pendant l'adolescence.

Le diabète de type 1, beaucoup moins fréquent (environ 6 % des cas de diabète traité de l'adulte), est principalement causé par la destruction des cellules bêta du pancréas, d'où l'incapacité de la personne atteinte à sécréter de l'insuline. Pour cette raison, les injections d'insuline sont vitales chez ces personnes. Cette forme de diabète survient essentiellement chez les enfants et les jeunes adultes.

Cette destruction est elle-même causée par une réaction auto-immune, comme en témoigne la présence d'auto-anticorps. (anticorps dirigé contre le Soi).

Chez les patients atteints de diabète de type 1, des cellules du système immunitaire, les lymphocytes T, se mettent à reconnaître des molécules du soi présentes dans les cellules bêta du pancréas, comme s'il s'agissait de molécules d'agents infectieux à éliminer. Le système immunitaire réagit de manière anormale : on parle alors de maladie auto-immune.

Les symptômes apparaissent plusieurs mois voire plusieurs années après le début de ces événements, quand plus de 80 % des cellules du pancréas ont été détruites.

Bien que l'administration à vie d'insuline constitue aujourd'hui la seule thérapeutique établie du diabète de type 1, elle est un traitement de remplacement qui ne s'adresse pas à la cause de la maladie.

Si l'on veut traiter la cause de la maladie il faut intervenir sur le système immunitaire, et plus particulièrement sur les lymphocytes de l'individu atteint, afin de stopper la progression de la maladie c'est à dire freiner la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas ; on parle alors d'immunothérapie.

Depuis maintenant près de 20 ans différentes approches d'immunothérapie ont été tentées dans le diabète de type 1 avec, pour certaines, des résultats très prometteurs notamment grâce à l'administration d'anticorps.

Ce projet a pour ambition d'atteindre par voie pharmacologique la sous-population de lymphocytes T concernée et de moduler la production par ces cellules des molécules toxiques qui sont à l'origine de la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques.

Le programme de développement de nouveaux médicaments destinés à traiter les maladies auto-immunes dont le diabète de type 1 fera appel à un modèle de souris qui développe la même forme de diabète, la souris *NOD* (non obèse diabétique). La souris *NOD* est un modèle animal du T1D qui développe une insulinite (invasion du pancréas par les cellules inflammatoires) dès 4-5 semaines d'âge, ce qui produit une destruction sélective des cellules bêta et un diabète à partir de 12 semaines d'âge.

L'apparition du diabète, plus fréquente chez les femelles, environ 60 à 80% contre 20 à 30% chez les mâles, à 40 semaines d'âge est sensiblement conditionnée par les conditions environnementales et d'hébergement, ceci nous obligera à caractériser le modèle dans un premier temps pour ensuite adapter le design de nos expériences.

Nous utiliserons ce modèle animal au cours de la période du développement de la maladie et de l'apparition des troubles liés au diabète (soit intense et par conséquent production importante d'urine). A cet âge les animaux ne présentent aucun symptôme et vivent normalement. Ils auront cependant dans leur environnement des accessoires qui ont pour objet d'enrichir l'environnement et améliorer les conditions d'hébergement. (Maisonnettes et accessoires de nidification). La première étape de caractérisation du modèle servira à mieux connaître l'incidence de l'apparition du diabète dans ce modèle, de manière à Réduire le nombre d'animaux et de l'optimiser lors des expériences ultérieures. La gravité des expériences sera considérée légère mais il est prévu de raffiner les conditions expérimentales et d'établir des points limites dans le cas où un animal montre des signes d'inconfort ou de souffrance, liés ou non à l'expérience, pour qu'il soit pris en charge de manière individuelle et améliorer son bien-être. Ces dispositions considérées dans leur ensemble contribuent au respect de la règle des 3R qui trace la ligne directrice de nos activités de recherche qui font appel à des animaux vivants. Les procédures expérimentales envisagées seront longues mais sans gravité, le nombre total d'animaux engagés sera de 2650 souris.

7096. La fibrose hépatique est la conséquence des mécanismes de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire, auto-immune ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique ou non alcoolique (NASH). La progression de la fibrose hépatique conduit à terme à la cirrhose, source de morbidité et de mortalité élevée.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement spécifique de la fibrose hépatique. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la fibrose hépatique, et ainsi de pouvoir proposer à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies fibrotiques dont la prise en charge représente des enjeux majeurs de santé publique.

Les procédures expérimentales présentées ici font partie d'un large programme d'évaluation de nouvelles molécules ayant pour objectif de combattre les maladies autoimmunes par une voie originale. Parmi toutes les pathologies auxquelles nous nous intéressons, certaines produiront une atteinte hépatique, liée au développement de la fibrose à l'origine de certaines formes de cirrhose ou d'hépatocarcinome. Nous focaliserons donc ici nos travaux sur la composante fibrose qui est associée à ces pathologies, quelle qu'en soit son origine, de façon à tester si le processus inflammatoire qui l'initie peut être combattu.

L'efficacité de nos produits sur le paramètre fibrose sera évaluée dans un modèle de rongeurs chez qui ce trouble est induit par un régime. Les variantes des procédures expérimentales proposées permettront de mieux cerner les propriétés préventives ou protectrices des produits ou au contraire de mettre en avant une activité dite curative.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours de la durée de 5 ans couverte par ce projet avec 4925 souris et 4925 rats.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3R. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal entier permet d'évaluer

la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». La fibrose hépatique est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux. Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle de « réduction », un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état ; il serait euthanasié par une méthode adaptée le cas échéant.

7097. Lors du développement d'un nouveau médicament à usage humain, il est indispensable de connaître ses propriétés pharmacologiques et son comportement dans un organisme.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule chez l'Homme, des tests *in vivo* chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Dans ce projet, des prélèvements sanguins de faible volume et peu fréquents permettront de doser la concentration plasmatique du médicament et de suivre son évolution chez le primate non humain. Les effets secondaires associés à l'administration d'une nouvelle molécule peuvent également être qualitativement et quantitativement étudiés en fonction du temps.

L'utilisation du modèle primate se justifie par la spécificité des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez eux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiologiques chez l'Homme. De plus, les procédures de ce projet permettront d'établir une stratégie de prédiction de la biodisponibilité de chaque molécule chez l'Homme et/ou d'évaluer leurs effets dont la finalité est d'ajuster la dose administrable à l'Homme.

Durant la période couverte par ce projet, il est prévu d'utiliser 20 macaques *cynomolgus* par an, soit un total de 100 animaux pour 5 ans. Ces animaux seront tous issus d'un élevage agréé. Pour chaque procédure réalisée, il sera veillé à utiliser un nombre minimal et suffisant d'animaux pour que les résultats soient interprétables et transposables à l'Homme. Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements ainsi qu'entre les administrations de la molécule étudiée. Des mesures préventives et correctives de diminution de la douleur et du stress seront déterminées au préalable de la réalisation de chaque procédure, ceci sur la base des données préliminaires recueillies sur la molécule et ses effets. Dans le cas où les animaux feront l'objet d'une réutilisation, un avis vétérinaire sera obligatoire pour justifier du bon état de santé de l'animal. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

7098. Avec l'allongement de l'espérance de vie, les pathologies osseuses telles que l'ostéoporose et l'arthrose représentent un problème de santé publique important. La perte osseuse ou ostéoporose touche principalement les femmes post-ménopausées : on estime ainsi qu'après 65 ans, 39% des femmes souffrent d'ostéoporose et qu'après 80 ans, cette proportion progresse à 70%. Cette perte osseuse fragilise l'os et augmente drastiquement le risque de fractures au niveau vertébral et du col fémoral. L'arthrose correspond à une atteinte du cartilage très douloureuse et affecte symptomatiquement 4.6 millions de patients en France (le genou fait partie des articulations les plus touchées). Actuellement, les prises en charge thérapeutiques pour ces pathologies s'avèrent peu efficaces à long terme. En effet, ces pathologies mettent en jeu plusieurs « compartiments » (osseux, médullaire et vasculaire) aux interactions complexes encore mal décrites, et qui ne peuvent être étudiées qu'*in vivo*.

La perte osseuse de l'ostéoporose est associée à une augmentation de la résorption osseuse, une diminution de la formation osseuse par les ostéoblastes, une diminution de la vascularisation et une augmentation progressive du nombre et du volume des adipocytes de la moelle. Plusieurs études cliniques et chez l'animal montrent une corrélation négative entre la quantité d'adiposité médullaire et la quantité d'os. L'atteinte du cartilage dans l'arthrose est précédée par de profonds changements de l'os sous-chondral avec une augmentation de l'angiogenèse et un remodelage osseux déséquilibré se traduisant par la formation d'excroissances osseuses à proximité de zones médullaires riches en adipocytes. L'adiposité médullaire pourrait donc jouer un rôle prédominant dans ces différentes altérations et constituer un indicateur prédictif voire une cible thérapeutique dans la prise en charge de ces pathologies osseuses. Toutefois, la grande hétérogénéité des



adipocytes médullaires, révélée par imagerie et histologie, et la difficulté d'isoler les adipocytes médullaires gênent notre compréhension de leur implication.

Les objectifs de ce projet sont donc d'étudier l'impact des adipocytes médullaires sur le microenvironnement osseux dans deux modèles murins obtenus par chirurgie : le modèle d'ovariectomie (Ovx) qui est reconnu pour mimer l'ostéoporose post-ménopausique et le modèle de déplacement du ménisque médian (DMM) qui est reconnu pour mimer l'arthrose du genou. Afin de reproduire les phases précoces et tardives des deux pathologies, deux temps d'analyse adaptés à chaque pathologie (4 semaines post-chirurgie pour l'Ovx et la DMM, et 14 ou 8 semaines post-chirurgie pour l'Ovx et la DMM respectivement) seront étudiés. L'objectif majeur est d'étudier l'évolution du phénotype des adipocytes dans ces deux modèles par expression génique. Cet objectif sera rempli après isolement *ex vivo* selon deux techniques. En effet, une première technique d'isolement est reproductible et globale mais requiert l'emploi de plusieurs souris pour obtenir un échantillon à analyser. Une seconde technique d'isolement est à mettre au point et à valider mais conduira à une réduction du nombre d'animaux pour caractériser nos modèles présents et futurs. Un second objectif de ce projet sera d'étudier l'impact microenvironnemental de ces deux modèles sur la capacité de différenciation des cellules stromales de la moelle osseuse. A terme, ce projet conduira à une meilleure compréhension du rôle physiopathologique des adipocytes médullaires dans l'ostéoporose et l'arthrose en lien avec les bouleversements du microenvironnement osseux.

Ce projet comporte donc 8 groupes expérimentaux : deux modèles chirurgicaux (Ovx, DMM), et leurs contrôles respectifs (opération fantôme pour l'Ovx et pour la DMM), deux temps d'analyses. Le nombre total de souris sera de 828 (324 femelles pour l'Ovx et 504 mâles pour la DMM).

Méthodes mise en œuvre pour le « Remplacement » :

Des approches *in vitro* – co-cultures à partir de cellules humaines commercialisées ou isolées d'échantillons humains obtenus lors de fractures ostéoporotiques ou de poses de prothèse- sont employées pour des études mécanistiques.

Méthodes mise en œuvre pour la « Réduction » :

Plusieurs échantillons déjà obtenus lors d'un précédent protocole seront réutilisés pour la réalisation de ce projet. Seuls sont prévus les animaux nécessaires pour renouveler, contrôler ou générer de nouveaux échantillons ou de nouvelles approches.

Méthodes mise en œuvre pour le « Raffinement », atténuer la souffrance et améliorer le bien-être des animaux :

Les conditions d'hébergement comprennent un enrichissement du milieu à base de ouate compressée à effiloche. Les souris sont acclimatées à leur environnement avant toute intervention. Les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie- analgésie appropriée et dans des conditions agréées. Le suivi post-opératoire des souris est quotidien pendant 15 jours puis hebdomadaire. Ces interventions chirurgicales n'empêchent pas la mobilité de la souris et les douleurs post-opératoires sont prises en charge. Si malgré tout, un signe de souffrance ou une mauvaise cicatrisation devait être détecté et ne puisse être corrigé par les moyens appropriés, la souris concernée serait euthanasiée afin d'éviter toute souffrance inutile.

7099. Le développement de l'élevage du sandre, est fortement limité par plusieurs points de blocages, parmi lesquels la saisonnalité de la production. Ce problème peut être contourné par le contrôle de la reproduction de populations domestiquées permettant d'étaler les pontes tout au long de l'année. Pour cela, il est nécessaire d'établir un programme photo-thermique optimal permettant l'induction du développement gonadique et les meilleures performances de reproduction, tout en prenant en compte les aspects économiques de la production.

Le cycle de reproduction des poissons téléostéens tempérés est strictement contrôlé par les fluctuations des conditions photo-thermiques. Il est communément établi que la photopériode est le facteur principal qui pilote le développement gonadique alors que la température est plutôt un facteur modulateur influençant principalement les phases finales de la maturation des gonades et la ponte. Actuellement les conditions environnementales appliquées pour induire les géniteurs de sandres domestiqués sont calquées sur celles utilisées pour la perche commune, une espèce de la même famille. Il a été montré que le développement gonadique de la perche commune doit comporter une longue phase de vernalisation (5 mois) à température faible (6°C) avec une photopériode courte (8h). Pour le sandre, il a été suggéré qu'une période de vernalisation de 3 mois à une température de 12°C est suffisante pour induire le développement gonadique. Suite à cette période de vernalisation, une augmentation de la température jusqu'à 14°C devraient être nécessaire à la phase finale de l'ovogenèse et la spermatogenèse. Cependant, l'impact de ces modifications sur la physiologie des géniteurs, la qualité des gamètes et le succès de la reproduction ne sont pas connus.

Chez les percidés, la période de vernalisation est cruciale pour la vitellogenèse, phase durant laquelle se met en place l'incorporation des constituants moléculaires du vitellus, principalement la vitellogénine, une protéine produite dans le foie. Au cours de cette phase se produit également le dépôt le plus important de lipides dans les ovocytes. Ils peuvent être d'origine exogène (alimentation) ou endogène (dans les tissus adipeux, les muscles et le foie). Ils sont déterminants pour

la qualité des œufs. Ceci implique donc que la stratégie d'alimentation doit être optimisée au même titre que le régime thermique pendant la phase de vernalisation.

Nous proposons d'étudier deux durées de la période de vernalisation (une courte et une longue) avec pour chacune trois températures différentes (6°C, 9°C et 12°C) ce qui fait 6 modalités en tout. 500 poissons seront répartis dans 12 bassins indépendants à raison de 41 poissons par bassin. Chacune de nos 6 modalités sera représentée en dupliqué (2 bassins). Quatre campagnes d'échantillonnage seront réalisées au cours du cycle de reproduction pour des prélèvements d'organes qui serviront à des analyses pour mieux comprendre l'effet de ces conditions de vernalisation sur la physiologie des poissons. Au cours de ces prélèvements 6 poissons par bassin et par temps seront prélevés (3 mâles et 3 femelles). Deux procédures de classe modérée seront réalisées lors de ces prélèvements : prise de sang, prélèvement précoce de sperme et d'ovocytes pour identifier le sexe des animaux prélevés. Les animaux seront systématiquement anesthésiés lors de ces procédures. Lors de la saison de reproduction, les poissons restants seront utilisés pour l'évaluation des performances de reproduction. A ce moment, quatre procédures de classe modérée seront effectuées : injection hormonale pour induire les pontes, suture des femelles pour éviter des pontes trop précoces dans les bassins et ainsi pouvoir exploiter l'ensemble des échantillons, vérification de l'ovulation et prélèvement manuel des gamètes mâles et femelles. Les poissons seront systématiquement anesthésiés avant chaque procédure. Le protocole expérimental a été façonné de façon à réduire le nombre de poissons à un nombre minimal susceptible de donner des résultats significatifs pour chaque prélèvement. Il n'existe pas d'alternative expérimentale fondée sur le recours à des modèles cellulaires ou moléculaires pour remplacer notre modèle biologique et répondre aux objectifs du projet. En effet, nous nous intéressons ici à une réponse physiologique qui concerne l'animal en entier à travers ces différentes composantes. Cependant, un certain nombre de mesures sera pris pour le respect du bien-être des animaux et préserver leur santé. Des analyses de qualité d'eau seront réalisés a minima 3 fois par semaine, les poissons seront nourris *ad libitum* quotidiennement, une observation quotidienne de leur état de santé sera réalisée. De plus, avant chaque manipulation, les poissons seront anesthésiés afin de raffiner les conditions d'élevage de nos animaux.

Ce projet vise à déterminer les conditions optimales de vernalisation chez les sandres domestiqués, ce qui permettra d'obtenir de meilleures performances reproductives, et donc un meilleur rendement pour les éleveurs. De plus, il leur permettra de faire d'énormes économies, car les coûts de refroidissement seraient plus faibles pour induire les phases finales du cycle de reproduction. Il permettra également de déterminer les voies de recherches principales qui suivront dans le domaine de l'induction du cycle de reproduction chez les téléostéens d'eau douce.

7100. Les maladies cardio-vasculaires présentent un enjeu important pour la médecine dans nos sociétés. La recherche dans le secteur « biologie et santé » est donc un axe prioritaire pour notre avenir, et la formation d'étudiants spécialisés dans ce domaine est indispensable. Une deuxième année de Master (niveau bac+5) axée sur la pathologie et la physiologie en biologie cellulaire s'effectue sur plusieurs universités d'Ile-de-France et comporte plusieurs spécialités, dont une proposant de nombreux cours théoriques mais aussi des ateliers pratiques en expérimentation animale.

Un Master a pour spécialité l'étude de l'hémodynamique, c'est-à-dire de la circulation sanguine et du rôle du cœur dans la circulation. Ce Master a pour objectif d'amener l'étudiant à devenir un acteur du progrès scientifique et médical dans le domaine cardio-vasculaire en développant ses connaissances et ses compétences, en lui permettant d'acquérir la maîtrise des concepts les plus récents en matière de biologie et de physiologie cellulaire cardiaque et vasculaire, et en lui apportant la maturité scientifique nécessaire au développement de son projet professionnel. Les étudiants proviennent essentiellement des filières médicales et scientifiques, et nombreux continuent sur une thèse, et deviennent de futurs médecins ou cadres des hôpitaux.

Ce Master traite de l'imagerie cardiaque et des explorations fonctionnelles, autrement dit des méthodes non-invasives et invasives. Le but de l'atelier pratique proposé au laboratoire est de faire prendre conscience à l'étudiant de l'intérêt des techniques invasives dans le domaine de la physiopathologie cardio-vasculaire. Pour cela, les étudiants assisteront à une expérimentation animale chez 2 espèces dites « gros animal » : le lapin et le porc.

Nous prévoyons d'utiliser 2 animaux de chaque espèce par an, soit 20 animaux sur 5 ans. Les deux modèles expérimentaux présentés aux étudiants sont des modèles dits de routine au sein du laboratoire, ne nécessitant aucune mise au point. Les modèles porcin et lagomorphe permettent, de par la taille du cœur, d'implanter des capteurs de mesure afin d'évaluer les paramètres hémodynamiques.

Le déroulement de la démonstration se décomposera d'abord par la phase d'anesthésie de l'animal aboutissant à une ventilation mécanique conventionnelle, puis par la phase chirurgicale au niveau du cœur permettant la pose de différents capteurs de mesure. Enfin, la démonstration se terminera par la phase de visualisation des signaux grâce à un logiciel d'acquisition et de traitement du signal. Les étudiants seront sollicités tout au long de cet atelier pratique afin de visualiser l'importance des techniques chirurgicales sur le « gros animal », et de prendre conscience de l'intérêt de ces modèles

expérimentaux dans la recherche en physiopathologie appliquée. Ainsi ils pourront échanger avec les intervenants techniques et scientifiques du laboratoire dans le but de réfléchir sur leur projet professionnel dans la recherche biomédicale.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'atteindre l'objectif du projet d'enseignement, qui permet de présenter les techniques existantes en recherche préclinique dans le domaine cardio-vasculaire. La plupart des étudiants, sinon tous, n'ont que peu d'expérience pratique, et n'ont travaillé qu'avec des souris. Nous prévoyons d'utiliser le minimum d'animaux pour un nombre adapté d'étudiants. L'anesthésie et l'analgésie seront adaptées afin de n'induire aucune souffrance inutile. Les animaux seront hébergés selon les normes en cours, et nous veillons à la bonne qualité des soins et à leur bien-être avant l'expérimentation.

7101. Les poux des livres sont des insectes aptères de la famille Psocoptera, du genre Liposcelis. *Liposcelis bostrychophila* est l'espèce la plus connue des poux des livres, elle infeste souvent les maisons. Des bactéries intracellulaires strictes ont été identifiées dans cette espèce des poux des livres depuis l'année 2000. En 2010-2011, *R. felis* a été isolée à partir de *L. bostrychophila*. Cette *R. felis* est très peu différente par rapport aux souches isolées à partir des puces, le vecteur confirmé de cette bactérie.

Des études menées sur le terrain par notre laboratoire ont mis en évidence la présence des poux des livres *L. bostrychophila* dans les poussières des lits des malades avec la fièvre à *R. felis* à Dielmo et à Ndiop au Sénégal. L'ensemble de ces poux collectés été infectés par *R. felis*, ce qui pose la question sur leur rôle comme réservoir et/ou source de contamination par *R. felis*.

L'espèce *L. bostrychophila* infectée par *R. felis* est maintenue en élevage dans notre insectarium.

Ce projet a pour but de clarifier le rôle des poux des livres infectés par *R. felis* dans la contamination des vertébrés via la voie aérienne.

Pour réaliser ce projet des souris BALB/c seront infectées par des aérosols générés des poux des livres infectés par *R. felis* ou par des aérosols générés d'une souche de référence de *R. felis* (à titre de groupe contrôle). Pour le confort de l'animal, un enrichissement sera mis en place à l'aide des igloos. Des points limites seront identifiés afin d'éviter toute souffrance inutile.

Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, poumons, foie, rate, cerveau, testicules, et tissu adipeux). Les critères principaux d'évaluation seront la recherche de *R. felis* dans ces différents tissus ainsi que l'étude de l'aspect histologique dans les organes prélevés. La réponse sérologique des souris à l'infection sera également étudiée. Ce projet nécessitera au total 115 souris. Il sera réalisé dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3.

7102. La réussite de la fécondation chez les mammifères domestiques est le résultat de la rencontre entre l'ovule et les spermatozoïdes. Lors d'une insémination artificielle avec de la semence, il est indispensable de déposer la semence dans le tractus génital femelle au moment adéquat afin que les spermatozoïdes puissent rencontrer l'ovule. Ceci nécessite de connaître la durée de transit nécessaire pour rejoindre le site de fécondation et la durée de survie des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle. Ce projet a pour but de déterminer ces paramètres chez le cheval et l'âne. Pour cela, des spermatozoïdes seront inséminés chez la jument, c'est-à-dire déposés dans l'utérus, et visualisés par une méthode d'endoscopie à intervalles réguliers après leur dépôt. Leur comptage dans les différents compartiments du tractus permettra de déterminer la vitesse du transit tandis que la mesure de leur mobilité permettra de déterminer leur durée de survie.

Ce projet implique 11 animaux : 5 étalons, 1 âne et 5 juments. Tous ces animaux sont des reproducteurs utilisés dans l'élevage pour la reproduction du troupeau et participent ponctuellement à ce protocole. Le nombre d'animaux inclus dans l'étude et les procédures expérimentales ont été choisis afin de respecter au maximum les pratiques des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement). Réduction : Les effectifs des lots d'animaux ont été calculés afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec un nombre minimum d'animaux. Remplacement : La complexité du processus de migration des spermatozoïdes dans le tractus génital femelle ne peut pas être étudiée par *in vitro* et nécessite de réaliser des études expérimentales *in vivo*. Raffinement : Les étalons, l'âne et les juments sont logés en bâtiment conventionnel sur aire paillée avec accès au pâturage, en visibilité et contact des congénères.

7103. L'objectif de ce projet est de tester deux outils pour l'évaluation du bien-être chez le cheval en vue de les développer pour une utilisation de terrain.

L'outil 1 est un protocole d'évaluation du bien-être du cheval, proposé sous forme d'une application pour tablettes et mobiles, et destiné à une utilisation de terrain.

Ce protocole est basé sur les 4 principes du bien-être développés par le Welfare Quality (alimentation, hébergement, santé et comportement) déclinés en 12 critères, mesurés par des indicateurs. Les indicateurs peuvent avoir trait à l'environnement du cheval (qualité de la litière), au cheval lui-même (blessures) ou à son comportement (approche humaine).

Pour ce premier outil, l'objectif est de valider (ou non) les indicateurs proposés.

Avant de tester l'outil sur le terrain, où il existe une grande variabilité (races, conditions de détention et d'utilisation) et où certaines mesures ne peuvent pas être faites (exemple dosages hormonaux), il est nécessaire de le faire dans des conditions expérimentales sur 2 lots contrastés, afin de vérifier si l'outil met bien en évidence les différences.

C'est l'objet du présent protocole. Les différents indicateurs proposés dans l'outil seront donc évalués par rapport à des indicateurs expérimentaux : comportementaux et physiologiques.

L'outil 2 est un accéléromètre qui permet de mesurer les déplacements et les activités des chevaux. Lors de perturbations du bien-être, ces différentes activités sont modifiées. L'outil se fixe à l'aide de scratches et de bandes de maintien au canon du cheval. La

présente expérimentation ne sera qu'une étape préliminaire pour savoir dans un premier temps, si l'outil est bien toléré par les chevaux, suffisamment robuste, et si les données enregistrées sont exploitables.

Le projet a une durée de 30 jours. Deux lots de 13 juments de race poney Welsh (soit un total de 26), seront détenues dans des conditions contrastées en matière de bien-être. Dans le lot « pré » les juments seront hébergées au pré en groupe et nourries au fourrage. Dans le lot « box » les juments seront hébergées en conditions appauvries alimentaires, spatiales et sociales.

L'outil 1 sera testé 1 fois par semaine. Ses résultats seront comparés avec des mesures comportementales par « scan sampling ». Les mesures physiologiques seront l'évolution des taux de cortisol et des formules sanguines, à partir de prélèvements sanguins réalisés en début, milieu et fin de protocole. Les modifications du tempérament seront évaluées par des tests de réactivité en début et fin de protocole.

Prise en compte de la règle des 3R :

Remplacement : Compte tenu de l'objectif du projet qui est d'évaluer un protocole appliqué au cheval le modèle animal ne peut être substitué par un autre type de modèle.

Réduction : Aucune étude n'a jusqu'à présent mesuré l'ensemble de ces indicateurs dans ces conditions contrastées. De plus, pour certains indicateurs, il n'y a pas de données permettant de prévoir les écarts entre les lots. Nous nous sommes donc basés sur 2 études, ayant obtenu des différences significatives sur certains des indicateurs, en conditions normales ou appauvries, qui avaient utilisé respectivement 19 et 25 chevaux. Nous avons donc choisi, en considération des possibilités d'hébergement de l'unité expérimentale, d'utiliser 26 animaux au total. Ceci nous permettra quelques retraits possibles, si nécessaire, dans chacun des lots.

Raffinement : Pour le lot box, l'objectif est de tester un milieu appauvri, donc l'enrichissement n'est pas envisageable. Néanmoins afin d'éviter des problèmes de santé majeurs (coliques, ulcères) les animaux seront sur paille et recevront deux repas quotidiens de foin correspondant à leurs besoins énergétiques.

7104. Objectifs du projet :

La finalité de ce projet de recherche transversal consiste à caractériser l'action de nouveaux composés pharmacologiques, dans le but de protéger ou de réparer la gaine de myéline et les fibres nerveuses dans le cadre de pathologies démyélinisantes, telles que la sclérose en plaques.

La preuve de concept a été obtenue avec deux candidats médicaments, ce qui a permis de développer 60 nouveaux composés qui ont fait l'objet d'un dépôt d'un brevet. Des études *in vitro* sont en cours afin de caractériser plus précisément certaines propriétés essentielles lors d'une utilisation thérapeutique. Il demeure toutefois qu'aucun de ces modèles n'intègre encore toutes les dimensions et tous les déterminants potentiels d'un organisme sain ou malade. Cette étude nécessite donc l'addition d'analyses effectuées *in vivo*, dans un modèle animal présentant une démyélinisation du système nerveux central (SNC) bien caractérisée. Le modèle de démyélinisation toxique par la cuprizone est bien décrit dans la littérature et maîtrisé par notre structure de recherche. La démyélinisation est obtenue par une modification du régime alimentaire des animaux qui ne présentent pas de signes cliniques. Elle est réversible et observable grâce à des techniques d'imagerie par résonance magnétique (IRM) sous anesthésie gazeuse, permettant un suivi longitudinal sans mise à mort de l'animal. Nous désirons affiner et valider les paramètres d'acquisition IRM et définir une grille de lecture clinique permettant de suivre l'évolution de chaque animal et de valider chaque point stratégique du modèle. Dans un second temps, l'impact des deux composés ayant permis d'avancer notre preuve de concept et pour lesquels nous détenons de nombreuses données *in vitro* et *in vivo* sera entreprise. Les analyses IRM seront incrémentées d'études immunohistochimiques afin de déterminer plus précisément les types cellulaires impliqués. Dans un troisième temps, nous exploiterons les données *in vitro* et *in vivo* obtenues grâce aux deux premières procédures afin d'optimiser l'étude de l'impact de deux molécules innovantes dans le cadre d'un projet collaboratif avec un partenaire privé (valorisation et exploitation du brevet).

Nombre et type d'animaux utilisés :

Cette étude préclinique sera réalisée sur un modèle animal utilisant des souris mâles de souche C57BL/6. Trois procédures expérimentales, découlant les unes des autres, seront effectuées. La première procédure expérimentale permet de définir une grille de lecture clinique du modèle, d'affiner et de valider les paramètres d'acquisition et de traitement des données IRM (42 animaux). La seconde procédure expérimentale permet d'affiner la procédure thérapeutique grâce à l'utilisation des deux composés bien caractérisés *in vitro* et *in vivo* et ayant permis de développer notre preuve de concept, dans les quatre stades du développement de la pathologie (1460 animaux). La troisième procédure permettra de recueillir des données objectives dans un modèle biologique intégré et de déterminer l'impact de deux molécules innovantes sur la destruction ou la réparation de la gaine de myéline et des fibres nerveuses (240 animaux).

1742 animaux seront donc nécessaires pour mener à bien ce projet. Le nombre de sujets nécessaires correspond au nombre minimal d'animaux permettant une interprétation sans ambiguïté de nos résultats.

Démonstration de la conformité aux 3Rs :

Remplacer : Les composés pharmacologiques étudiés dans ce projet font tous l'objet d'études *in vitro* (pharmacocinétique et toxicologie cellulaire) préalables aux analyses *in vivo*. Ces résultats permettront de sélectionner les deux molécules innovantes les plus pertinentes parmi les 60 nouveaux composés présents dans le brevet. Les données *in vitro* et *in vivo* que nous détenons déjà pour les composés ayant permis d'avancer notre preuve de concept ont été prise en compte lors de la conception des procédures.

Réduire :

La recherche d'une grille de lecture clinique permettra de parfaire le suivi de l'évolution de chaque individu. L'utilisation de techniques IRM nous permettra de suivre les modifications présentes au sein du SNC durant 12 semaines, sans mise à mort des animaux. Notre plan d'expériences imbriquées permettra de limiter le nombre d'individus. Un grand nombre d'animaux seront euthanasiés durant la seconde procédure expérimentale afin de valider un seul protocole d'administration et deux fenêtres thérapeutiques. Les données des animaux témoins seront réutilisées.

Raffiner : Le modèle de démyélinisation est maîtrisé par notre équipe et répandu dans les laboratoires étudiant la physiopathologie des phénomènes démyélinisants/remyélinisants. Les points d'analyses nécessitant une euthanasie ont été clairement définis grâce à la bibliographie. Leur pertinence pour chaque animal sera attestée par l'utilisation d'une grille de lecture clinique affinées et d'un suivi IRM longitudinal.

7105. Les vésicules extracellulaires (VEs) sont des fragments membranaires de petite taille expulsés par différents types cellulaires, qui circulent dans les fluides corporels et transportent ADN, ARN et protéines vers des cellules cibles. Ce projet vise à définir le rôle des vésicules extracellulaires tumorales (VET) dans la formation de métastases *in vivo*.

Pour cela différentes lignées cellulaires cancéreuses fluorescentes seront injectées, en présence ou non de vésicules extracellulaires tumorales chez la souris et les tumeurs ainsi générées seront alors analysées *in vivo* par imagerie intra-vitale. L'approche proposée est originale et innovante et utilise l'imagerie intra-vitale pour visualiser un événement à l'échelle de la microscopie optique pour le suivre ensuite au niveau de l'échelle de la microscopie électronique (l'acronyme de cette approche est appelé CLEM pour "correlative light and electron microscopy").

Réduire :

Le nombre d'animaux nécessaire a été déterminé au minimum mais néanmoins suffisant pour pouvoir réaliser une analyse statistique pertinente. Le protocole expérimental prend en compte un potentiel impact sur la souffrance animale et différents critères ont été établis pour justifier un arrêt de l'expérience en cours. Une étude exhaustive des données récentes de la littérature n'a pas permis d'identifier une équipe réalisant des expériences similaires. De plus l'équipe est un des leaders mondiaux de ce type d'approche.

Raffiner :

Des points limites ont été établis pour éviter toute souffrance animale. Les souris sont maintenues en groupe de 5 par cage pour maintenir une interaction entre individus. L'environnement d'élevage est enrichi à l'aide de carrés de cellulose pour la construction des nids et de tunnels et balancelle en plastique rouge pour favoriser l'activité des souris. Les souris ont accès ad libitum à une nourriture de type normal (RM1, Dietex) et à de l'eau filtrée. Si une souris présentait des symptômes traduisant l'apparition de douleurs (réduction de la réactivité, difficulté de locomotion, fourrure non entretenue, tendance à l'isolement) une injection en IP d'un analgésique sera effectuée une fois par jour (kétoprofène 1%, à raison de 15microL/10g de souris) jusqu'à disparition des symptômes.

Remplacement :

Le modèle animal est nécessaire car il n'existe pas de modèle pour reproduire *in vitro* la cascade d'évènements qui sont analysés ici. 240 souris seront utilisées dans ce projet.

7106. Les phénomènes physiologiques décrits par Cabanac et Duclaux (1973) et par Yeomans (2006) sous les termes d'alliesthésie ou de « Sensory Specific Satiety » selon lesquels l'état nutritionnel d'un individu ou d'un animal module spécifiquement la perception des odorants de nature alimentaire a reçu à ce jour peu d'explications scientifiques. L'existence d'un mécanisme neuronal de contrôle qui expliquerait une modulation possible de la perception olfactive par les centres de régulation de la prise alimentaire est suspectée. Cependant, la nature des réseaux impliqués dans ces phénomènes reste à ce jour mal comprise. Notre objectif est de mettre à jour la structure des réseaux neuronaux liant ce système d'intégration sensoriel olfacto-gustatif et le système de contrôle de l'homéostasie énergétique. Cette connaissance est nécessaire afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la prise alimentaire et ses conséquences en termes d'obésité en cas de dérégulation. Pour cela nous appliquerons chirurgicalement sous anesthésie totale des virus PRV Bartha. Ces virus ont la propriété de migrer le long des terminaisons et de franchir les synapses permettant ainsi de tracer l'ensemble des neurones interconnectés et donc afin de visualiser un (des) circuit(s) neuronaux impliqués dans une fonction. Les virus PRV Bartha sont atténués c'est-à-dire qu'ils ont perdu leur virulence, les animaux vivent ainsi beaucoup plus longtemps après infection sans symptômes. Les animaux seront euthanasiés avant l'apparition de ces symptômes. 30 souris mâles de souche C57BL/6 seront utilisées. Ces virus ne sont pas transmissibles aux primates et donc à l'homme. L'approche *in vitro* ne peut être utilisée comme tentative de remplacement. En ce qui concerne la réduction du nombre d'individus, les effectifs de souris envisagés seront limités à ce qui est nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques fiables pour une publication des résultats, afin que la communauté scientifique puisse bénéficier des données obtenues et ainsi éviter une redondance avec des expérimentations ultérieures. Enfin, pour le volet raffinement, notre expérimentation prévoit un suivi rigoureux de la souffrance et l'interruption de l'expérience au moindre signe de pathologie induite par l'injection virale.

Les données obtenues chez la souris permettront aussi de mieux comprendre les mécanismes nerveux impliqués dans certaines pathologies du comportement alimentaire chez l'Homme.

7107. La neurogénèse, la création de nouveaux neurones dans le cerveau, repose sur la prolifération de cellules souches et de progéniteurs neuronaux. Le contrôle précis de cette prolifération est indispensable pour que le bon nombre de neurones soit généré au bon endroit et au moment approprié. De nombreuses études chez la mouche drosophile montrent que l'état nutritionnel est capable de déclencher l'initiation ou l'arrêt de la prolifération. Chez cet animal, le couplage état nutritionnel/prolifération cellulaire est médié par des processus biochimiques qui contrôlent le métabolisme des lipides.

Nous souhaitons savoir si l'état nutritionnel régule le nombre de cellules souches en prolifération dans le cerveau des vertébrés, et si cette régulation repose sur les mêmes processus biochimiques que ceux décrits chez la drosophile. Nous utiliserons comme modèle d'étude le poisson-zèbre. En parallèle, nous souhaitons documenter les profils lipidiques du cerveau en fonction de l'état nutritionnel

et des niveaux d'activité des processus biochimiques qui nous intéressent, afin notamment d'identifier les acides gras essentiels qui seraient nécessaires au bon fonctionnement des cellules souches neurales.

Le projet repose sur deux procédures : pour modifier l'état nutritionnel des poissons, nous allons les soumettre à une restriction calorique au moyen d'un jeûne. Les poissons sont des organismes dits ectothermes : leur température corporelle est identique à celle de l'eau dans laquelle ils vivent. Au contraire des mammifères ils ne dépendent donc aucune énergie pour maintenir leur température. A masse équivalente, leurs besoins caloriques sont donc bien inférieurs à ceux des mammifères ce qui les rends tolérants à des périodes de restriction alimentaire auxquelles ils sont d'ailleurs confrontés en milieu naturel. Le second type de procédure que requiert notre projet est l'application de composés pharmacologiques par baignade dans de l'eau d'aquarium. Ces composés nous permettront de mesurer le nombre de cellules en prolifération et d'inhiber les processus biochimiques qui coupleraient état nutritionnel et prolifération cellulaire.

Plusieurs mesures sont prévues dans le respect de la règle des 3R. Le projet est découpé en étapes pour éviter de mettre inutilement des poissons à jeun. Le nombre de poisson par lot est limité au strict minimum qui permette de mesurer la prolifération cellulaire selon les standards du domaine et de disposer de suffisamment de tissus pour les analyses biochimiques qui permettront de connaître les profils lipidiques. La procédure de jeûne est basée sur un point limite qui assurera de ne pas mettre en péril la vie des poissons. Ce projet nécessitera 240 poissons au maximum.

7108. La radiothérapie est un traitement très efficace contre le cancer mais elle peut provoquer des dommages sur les tissus sains qui affectent la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles stratégies de radiothérapie très efficace contre le cancer et mieux tolérées par les tissus sains. Nos études précliniques antérieures montrent que l'irradiation de modèles murins avec un irradiateur LINAC qui produit des électrons de 4.5 MeV à très haut débit de dose (> 40 Gy/s), appelée irradiation FLASH, permet d'éliminer les tumeurs sans dommages pour les tissus sains. Cette protection des tissus sains serait due au fait que l'irradiation FLASH protège spécifiquement les cellules souches normales capables de réparer le tissu lésé dans lequel elles résident, alors que les cellules tumorales (souches ou non-souches) sont tuées par l'irradiation FLASH.

Nous voulons ici valider cette observation avec un irradiateur de haute énergie pouvant produire soit des électrons, soit des photons X à ultra haut débit de dose (FLASH). Nous chercherons à démontrer que l'irradiation FLASH protège les cellules souches normales et élimine les cellules tumorales indépendamment du type de rayonnement. Nous caractériserons ensuite les bases biochimiques de cette protection différentielle. Ces expériences seront réalisées sur deux modèles tissulaires que nous maîtrisons, le cerveau (sain et injection intracrânienne de Glioblastome murin) et le système hématopoïétique.

Ces expériences doivent être réalisées chez l'animal car l'effet protecteur du FLASH nécessite un environnement complexe qui n'est pas retrouvé *in vitro*.

Cette étude est réalisée chez un modèle murin identique à celui utilisé dans nos expériences antérieures réalisées avec des électrons de 4.5MeV, afin de pouvoir comparer nos résultats. Les interventions sur les animaux (irradiation et chirurgie) seront pratiquées sous anesthésie. Une analgésie sera administrée systématiquement après greffes intracrâniennes par stéréotaxie pour éviter toute souffrance des animaux.

Le nombre d'animaux (84) est le minimum requis afin de pouvoir réaliser une analyse statistique fiable.

Les animaux sont hébergés selon les règles en vigueur dans l'animalerie, des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire en charge de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

7109. En collaboration avec un laboratoire extérieur, nous avons pour objectif d'étudier et développer une nouvelle approche innovante (combinaison de CRISPR/Cas9 = ciseaux à ADN : technique de suppression et d'insertion de gènes sur des sites spécifiques et d'un vecteur de transport innovant. Ce système de thérapie génique, s'il fonctionne efficacement, pourrait à terme être transféré chez l'Homme pour soigner des maladies génétiques.

Nous développerons notre système de thérapie chez des souris modèles de la maladie de Duchenne (MD). Chez l'Homme, cette maladie génétique provoque une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Elle est liée à une anomalie du gène DMD, responsable de la production d'une protéine impliquée dans le soutien musculaire. Ce gène étant situé sur le chromosome X, 99.9% des malades sont des garçons. On compte 25000 personnes environ affectées par la maladie en France. La maladie se manifeste généralement vers 3 ans, avec des chutes et des difficultés à se relever traduisant une faiblesse musculaire. Les muscles respiratoires, cardiaques et digestifs sont également touchés. Ainsi, la quasi-totalité des garçons atteints sont en fauteuil roulant à l'âge de 12 ans. L'espérance de vie, du fait de l'aggravation des troubles respiratoires, est en moyenne d'à peu près 25 ans. Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de guérir de la maladie. La prise en charge des patients repose sur la prévention et le traitement des complications, notamment des complications cardiaques et respiratoires. Seuls des corticoïdes sont utilisés pour tenter de ralentir la progression de la maladie.

Notre but sera d'utiliser le système "ciseaux à ADN" pour réparer des mutations génétiques héréditaires et corriger localement le phénotype lié à la maladie via différentes voies d'injections chez des souris modèles de cette maladie. Ce système devrait faciliter la suppression de la partie malade du gène et ainsi reproduire une protéine au moins partiellement fonctionnelle. Des articles récents ont déjà montré la faisabilité d'une approche similaire pour la maladie de Duchenne. Ici, le but est d'adapter ces travaux en utilisant notre vecteur de transport innovant qui devrait permettre de limiter les effets secondaires et les risques de cette correction génétique contrairement aux systèmes publiés.

Remplacement : Une étude *in vitro* a déjà été réalisée à partir de myoblastes malades montrant la restauration de l'expression du gène DMD. L'étude de maladie génétique humaine et l'approche de thérapie génique nécessite l'utilisation d'expériences *in vivo* et ne peut donc pas être remplacée par des expériences *in vitro*.

Réduction : L'effectif des animaux est réduit au maximum. Un test statistique adapté sera utilisé pour l'analyse des résultats et tenant compte des risques de mortalité. 240 animaux seront nécessaires à l'étude.

Raffinement : Afin de réduire tout stress ou souffrance, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Ainsi, des points limites éthiques seront établis afin d'arrêter les procédures en cas de douleur difficile à traiter à l'aide d'antidouleurs.

A l'issue des études et grâce au partenariat avec le laboratoire extérieur, les données obtenues pourront servir à développer de nouvelles techniques de thérapie génique.

Les eaux marines côtières sont soumises à deux sources de variabilité physico-chimique, l'une naturelle (ex : saisonnière, tidale, météorologique...) l'autre résultant des activités anthropiques (ex : eutrophisation, contamination, changements climatiques...). Ces sources de variabilité combinent leurs effets et affectent, de manière plus ou moins prévisible, les caractéristiques abiotiques (ex : salinité, température, oxygénation) mais également biotiques (ex : prédateurs proies) de l'habitat des organismes marins. Face à cette variabilité environnementale, les poissons disposent de capacités d'ajustement importantes, tant physiologique, que morphologique, que comportementale, préservant ainsi leur capacité à exploiter les ressources présentes dans leur environnement. L'analyse de la littérature montre que les auteurs ont considérés la relation poisson-milieu essentiellement sous l'angle de la physiologie, laissant de côté les aspects morphologiques et comportementaux. L'objectif du présent travail vise à améliorer notre compréhension de la relation poisson-milieu en développant le volet comportemental.

Quelques soient les traits étudiés, qu'ils soient physiologiques, morphologiques ou comportementaux, on note généralement une forte variabilité interindividuelle au sein des populations de poissons. Cette diversité phénotypique est une des composantes de la résilience des populations à la variabilité environnementale. En effet, face à une même perturbation, un groupe d'individus est ainsi susceptible d'exprimer une large palette d'ajustements comportementaux, favorisant ainsi l'émergence d'une réponse adaptée garantissant la pérennité de la population. A titre d'exemple, des animaux téméraires vont plus profiter des opportunités (e.g. ressource alimentaire, abri, habitat) présentes dans leur environnement mais seront également plus sujet à la prédation. En revanche, les animaux moins téméraires profiteront moins de opportunités pouvant s'offrir mais seront également moins soumis à la prédation. Les activités anthropiques sont à l'origine de nombreuses perturbations environnementales. Parmi celles-ci les rejets accidentels d'hydrocarbures ont des impacts qui restent mal évalués tant sur le plan économique qu'écologique. Chaque année plus d'un milliard de litres d'hydrocarbures sont rejetés dans les océans, majoritairement en relation avec la production de pétrole, son transport et son utilisation. De nombreuses études ont examinés les effets des hydrocarbures sur la physiologie des poissons. En revanche, très peu d'études ont examiné leurs effets sur les performances comportementales. Les quelques études disponibles suggèrent pourtant qu'une exposition à des hydrocarbures est susceptible d'altérer la capacité des animaux à percevoir les stimuli environnementaux affectant ainsi l'étendue de leur registre comportemental (ex : distribution, migration, relation prédateur/proie). Parmi les comportements écologiquement importants, des études ont montrées que le comportement social (sociabilité) présente une forte variabilité interindividuelle et semble être le trait de caractère le plus sensible aux variations environnementales ou à l'état physiologique (ex : jeûne). La sociabilité est particulièrement pertinente chez notre modèle biologique (*Dicentrarchus labrax*), les juvéniles de cette espèce vivant en groupe.

En cas d'une marée noire, une des stratégies de réponse est l'utilisation de dispersants chimiques pour le traitement de la zone touchée. Mais les répercussions d'un tel traitement ne sont pas encore bien évaluées, cela pourrait notamment augmenter la toxicité du pétrole. Aussi leur utilisation reste controversée. La présente étude a donc pour objectif d'évaluer l'impact de trois situations rencontrées suite à une marée noire (pétrole ; pétrole + dispersant ; dispersant) sur trois réponses comportementales : la témérité dans un nouvel environnement ; la réponse à une stimulation sociale positive et la réponse à une stimulation sociale négative. Cette étude envisage de faire un suivi temporel de ces réponses comportementales sur une période de deux mois post-exposition.

Notre modèle sera le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), une espèce importante tant en termes écologique qu'économique. L'analyse de l'expression des traits de caractères implique l'utilisation d'animaux vivants (Remplacement). Ce projet mobilisera 500 poissons, répartis en 8 groupes. Les nombres de groupes et de poissons ont été déterminés par des calculs de puissance statistique reposant sur la mise en œuvre d'analyses de variance. Ces nombres sont optimisés afin de permettre la prise en compte de l'étendue de la variabilité interindividuelle naturelle (Réduire), tout en tenant compte des contraintes zootechniques telles que la densité minimale d'animaux requise en élevage pour ne pas induire de perturbations comportementales (Raffiner).

7110. En collaboration avec un laboratoire extérieur, nous avons pour objectif d'étudier et développer une nouvelle approche innovante (combinaison de CRISPR/Cas9 = ciseau à ADN : technique de suppression et d'insertion de gènes sur des sites spécifiques et d'un vecteur de transport innovant. Ce système de thérapie génique, s'il fonctionne efficacement, pourrait à terme être transféré chez l'Homme pour soigner des maladies génétiques.

Nous développerons notre système de thérapie chez des souris modèles de la maladie de Duchenne (MD). Chez l'Homme, cette maladie génétique provoque une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Elle est liée à une anomalie du gène DMD, responsable de la production d'une protéine impliquée dans le soutien musculaire. Ce gène étant situé sur le chromosome X, 99.9% des malades sont des garçons. On compte 25000 personnes environ affectées par la maladie en France. La maladie se manifeste généralement vers 3 ans, avec des chutes et des difficultés à se relever traduisant une faiblesse musculaire. Les muscles respiratoires, cardiaques et digestifs sont également touchés. Ainsi, la quasi-totalité des garçons atteints sont en fauteuil roulant à l'âge de 12 ans. L'espérance de vie, du fait de l'aggravation des troubles respiratoires, est en moyenne d'à peu près 25 ans.

Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de guérir de la maladie. La prise en charge des patients repose sur la prévention et le traitement des complications, notamment des complications cardiaques et respiratoires. Seuls des corticoïdes sont utilisés pour tenter de ralentir la progression de la maladie.

Notre but sera d'utiliser le système "ciseau à ADN" pour réparer des mutations génétiques héréditaires et corriger localement le phénotype lié à la maladie via différentes voies d'injections chez des souris modèles de cette maladie. Ce système devrait faciliter la suppression de la partie malade du gène et ainsi reproduire une protéine au moins partiellement fonctionnelle. Des articles récents ont déjà montré la faisabilité d'une approche similaire pour la maladie de Duchenne. Ici, le but est d'adapter ces travaux en utilisant notre vecteur de transport innovant qui devrait permettre de limiter les effets secondaires et les risques de cette correction génétique contrairement aux systèmes publiés.

Remplacement : Une étude *in vitro* a déjà été réalisée à partir de myoblastes malades montrant la restauration de l'expression du gène DMD. L'étude de maladie génétique humaine et l'approche de thérapie génique nécessite l'utilisation d'expériences *in vivo* et ne peut donc pas être remplacée par des expériences *in vitro*.

Réduction : L'effectif des animaux est réduit au maximum. Un test statistique adapté sera utilisé pour l'analyse des résultats et tenant compte des risques de mortalité. 240 animaux seront nécessaires à l'étude.

Raffinement : Afin de réduire tout stress ou souffrance, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale. Ainsi, des points limites éthiques seront établis afin d'arrêter les procédures en cas de douleur difficile à traiter à l'aide d'antidouleurs.

A l'issue des études et grâce au partenariat avec le laboratoire extérieur, les données obtenues pourront servir à développer de nouvelles techniques de thérapie génique.

7111. Le mode de développement des bactéries en communautés microbiennes structurées appelées biofilms représente un mode de vie privilégié car il leur permet de survivre en milieu hostile et de coloniser de nouvelles surfaces. Chez l'homme, les biofilms sont impliqués dans un grand nombre d'infections bactériennes qui évoluent fréquemment vers des infections chroniques. Ces infections sont très difficiles à éradiquer car les communautés bactériennes des biofilms sont particulièrement résistantes aux traitements anti-infectieux et capables de contourner les attaques du système immunitaire de l'hôte. Une meilleure prise en charge de ces pathologies nécessite de mieux connaître les interactions hôte-pathogène mises en jeu. En particulier, il apparaît essentiel d'identifier et de caractériser, spatio-temporellement, les signatures fonctionnelles de 3 populations de leucocytes : les polynucléaires neutrophiles (PMN), les macrophages (Mo) et les cellules dendritiques (DC) qui interagissent avec ces communautés bactériennes au niveau de leurs tissus cibles. L'étude portera sur les biofilms de *Klebsiella pneumoniae* et de *Staphylococcus aureus*, deux espèces bactériennes qui ont des tropismes différents chez l'homme, mais dont la capacité commune à produire des biofilms a un fort impact en santé humaine. Le choix de l'espèce bactérienne *K. pneumoniae* en particulier s'avère d'autant plus pertinent que des souches hypervirulentes multirésistantes ont émergé ces dernières années et touchent des sujets jeunes et en bonne santé.

Nous étudierons *in vivo* en fonction du temps la réponse immunitaire à l'échelle tissulaire chez l'animal vivant, après inoculation d'une bio-matrice contenant l'une ou l'autre espèce bactérienne sous forme planctonique ou de biofilm. Le modèle retenu sera le modèle murin et les tissus analysés seront la peau pour *Staphylococcus aureus*, et le foie pour *K. pneumoniae*.

Après injection de la bactérie, les souris seront gardées en observation pendant 2 heures et regroupées à plusieurs par cage. S'il y a bagarre, elles seront immédiatement séparées. Ensuite, les animaux sont pesés chaque jour, et ce pendant toute la durée de l'expérience.

Le nombre d'animaux utilisés est égal à 300 et est réduit au minimum dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Pour les expériences d'imagerie intravivante (microscopie confocale, approche de bioluminescence), le nombre d'animaux requis sera faible car cette approche permet d'étudier la réponse immunitaire chez un même animal en fonction du temps, après anesthésie. Le recours à l'anesthésie permet d'éviter tout stress, inconfort ou douleur chez l'animal. Les expériences sont de courte durée (6 jours maximum) et la réponse inflammatoire observée localement au point d'injection est minime.

Pour les approches de bioluminescence (quantification de la charge bactérienne dans les tissus) et les approches immunologiques (phénotypage des cellules immunitaires recrutées au niveau tissulaire), le nombre d'animaux utilisés est réduit et fixé à 10 pour chaque souche bactérienne testée et pour chaque forme bactérienne : planctonique ou en biofilm. Ce chiffre a été défini selon la puissance statistique et la variabilité des paramètres étudiés.

Point limite : toute souffrance apparente de l'animal repérable en surveillance journalière : poil hérissé, baisse de la motricité mènera cependant à l'arrêt immédiat de l'expérimentation avec euthanasie des animaux.

Dans son ensemble, cette étude nous permettra d'appréhender dans sa globalité la réponse immunitaire innée vis-à-vis des biofilms bactériens.

7112. La diméthylarginine asymétrique (ADMA) est un marqueur biologique de la dysfonction endothéliale et de facteurs de risques de pathologies cardiovasculaires, dont les concentrations plasmatiques sont élevées dans le cas de l'obésité compliquée du syndrome métabolique. Un taux plasmatique élevé d'ADMA présente également une association robuste avec l'insulino-résistance. Au niveau du muscle squelettique, l'ADMA inhibe la synthèse de monoxyde d'azote (NO) en agissant sur la NO synthase endothéliale (eNOS) présente au niveau vasculaire et la NO synthase neuronale (nNOS) présente dans les cellules musculaires.

Que ce soit au repos sous l'action de l'insuline, comme lors de l'exercice suite à une contraction musculaire, le NO favorise la perfusion musculaire et le recrutement microvasculaire et permet ainsi la bonne captation du glucose. Certains travaux ont permis de démontrer que des inhibiteurs pharmacologiques des NOS diminuaient la captation du glucose au repos et lors de l'exercice, du fait d'une réduction de la perfusion musculaire.



Notre objectif est de déterminer si la perfusion et la captation musculaire du glucose en condition d'hyperinsulinémie au repos, et d'exercice seront significativement réduites par l'ADMA via son action inhibitrice des NOS. L'objectif secondaire sera d'établir si l'ADMA inhibe sélectivement l'une des 2 isoformes (neuronale ou endothéliale) des NOS présentes dans le muscle squelettique dans les 2 bras expérimentaux qui seront employés (hyperinsulinémie et exercice).

Pour réaliser ce projet, 66 rats mâles de Wistar, âgés de 15 à 20 semaines et de statut sanitaire conventionnel seront utilisés. Ces animaux seront hébergés en environnement conventionnel pendant toute la durée du projet et seront distingués en 6 groupes : pour chaque bras expérimental (hyperinsulinémie ou exercice) un groupe sera traité avec ADMA, un 2nd groupe avec un inhibiteur sélectif des nNOS (S-Methyl-L-Tiocitrulline, SMTC) +ADMA, et un 3ème groupe servira de groupe contrôle.

Le choix de l'utilisation d'un modèle de rats est basé sur des résultats de la littérature ayant montré la faisabilité du protocole ici proposé pour étudier les effets d'autres inhibiteurs des NOS au cours de l'exercice ou de l'hyperinsulinémie. Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux (n=11 par groupe) a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles).

Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales (n°1: Implantation de cathéters artériel (carotide) et veineux (jugulaire) chroniques, n°2: Exercice de course sur tapis roulant avec infusion de 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose), n°3: Etude de l'inhibition par l'ADMA de la captation musculaire insulino-dépendante du glucose chez le rat conscient et mobile, et n°4 : Prélèvement des muscles EDL, soleus et gastrocnemius des membres inférieurs et du cœur (pour analyses biochimiques)) seront réalisées en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés. La procédure n°1 sera réalisée sous anesthésie générale pour ne pas induire de souffrance pour les animaux utilisés. La moitié de chaque groupe d'animaux sera attribué de manière aléatoire à la procédure n°2, et la moitié à la procédure n°3. Les procédures n°2 et n°3 seront réalisées en limitant les temps de contention pour les animaux lors des prélèvements et en utilisant les cathéters implantés lors de la procédure n°1. Les animaux seront euthanasiés pour certaines procédures.

7113. L'obésité est un problème de santé publique avec en 2012, 49,6 % des français en surpoids ou obèses qui développent des complications nécessitant une prise en charge thérapeutique. Les complications hépatiques, NAFLD pour maladie du foie non alcoolique, peuvent évoluer jusqu'à la cirrhose ou le cancer du foie comme on l'observe également pour la maladie alcoolique du foie (MAF). Les NAFLD ne sont pas observées chez tous les patients obèses, il y a donc d'autres facteurs que l'obésité qui jouent un rôle. Le rôle de l'alimentation est démontré et plus récemment celui des bactéries intestinales hébergées par notre tube digestif. L'ensemble de nos bactéries intestinales est appelé microbiote (MI). Ces bactéries sont elles-mêmes sous la dépendance de notre alimentation. Les NAFLD sont associées à un MI différent de celui trouvé chez des patients obèses sans complications hépatiques. De la même manière lors de la MAF, tous les patients, alcooliques ne développent pas de lésions hépatiques et les bactéries intestinales sont impliquées.

Les analyses des espèces bactériennes entre la MAF et la NAFLD suggèrent que certaines bactéries pourraient jouer un rôle dans ces 2 maladies. Nous voulons démontrer que des bactéries spécifiques sont impliquées dans les complications hépatiques quelque en soit la cause, alcool ou obésité. Nous voulons identifier des bactéries protectrices chez les patients obèses ou alcooliques ne développant pas de lésions hépatiques et les bactéries délétères provenant des patients malades du foie. Nous réaliserons également des traitements avec de la pectine dont les effets protecteurs ont été démontrés dans la MAF. Le but est de se diriger vers le développement de probiotique (bactéries) et de prébiotique (pectine) utilisables comme traitement chez les patients.

Les complications hépatiques observées au cours de l'obésité mettent en jeu des interactions entre les différents organes qu'il est actuellement impossible de reproduire *in vitro*. Il nous faut étudier l'effet de l'alimentation sur les bactéries intestinales, l'effet de ces bactéries sur la barrière intestinale et au final l'impact de cette atteinte sur le développement des lésions du foie. Le seul modèle auquel nous pouvons avoir recours est l'animal (Remplacement). Le rongeur, ici la souris, partage bon nombre de processus cellulaires avec l'Homme et seront utilisées comme modèle.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement). Afin de minimiser le nombre de souris, la procédure 3 est réalisée sur un nombre de groupes restreint. Si les résultats sont positifs la répétition de l'expérience étant indispensable, les groupes contrôles seront réalisés à ce stade dans une procédure 4. En revanche si les résultats sont négatifs la procédure 4 ne sera pas effectuée (Réduction). Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour l'animal en souffrance. Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subies par les animaux, par un enrichissement approprié (Raffinement). Au total ce projet nécessite l'utilisation de 266 animaux.

7114. La vitamine A est essentielle. Notre recherche consiste à comprendre les mécanismes que la vitamine A contrôle pour exercer ses effets. Le testicule est notre modèle d'étude car son fonctionnement est altéré en cas de carence en vitamine A, et il intègre de nombreuses problématiques (cellules souches ; identité, destin, prolifération et morphogenèse cellulaire ; divisions mitotique et méiotique, mort cellulaire).

Remplacement : La spermatogenèse est un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires du testicule. Notre étude vise à comprendre les effets de la vitamine A dans un système physiologique. Seule une approche expérimentale avec des animaux permet de répondre à ces questions. Le remplacement par un système *in vitro* (1er R de la règle des 3R) est impossible. La souris est le modèle de choix car sa spermatogenèse dépend de la vitamine A, comme chez l'homme. Nous combinons des approches génétiques et pharmacologiques pour comprendre comment la vitamine A exerce ses effets. Nous créons des souris porteuses d'une ou plusieurs mutations. Les protocoles mis en œuvre permettent de provoquer une carence alimentaire en vitamine A.

Réduction : Le nombre d'animaux requis est 390 souris au maximum. Ces nombres sont calculés au plus juste pour satisfaire aux exigences en matière de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en assurant la qualité des résultats obtenus et la robustesse de leur validité statistique. La réduction du nombre d'animaux (2e R de la règle des 3R) est donc appliquée dans notre projet.

Raffinement : Les animaux ne souffrent pas car le phénotype se limite à la stérilité des mâles. Nous tentons d'induire ou de corriger cette stérilité. Aucune des étapes expérimentales mises en œuvre n'engendre de la douleur aux animaux (autre que celle de l'injection des produits). Le bien-être est surveillé en permanence et toute altération du comportement des animaux (souffrance, angoisse) sera immédiatement discutée avec les responsables de la structure du bien-être animal (SBEA) pour prendre les mesures correctives nécessaires. Nous respectons ainsi le raffinement (3e R de la règle des 3R) dans ce projet.

7115. Les peptides sont des composés chimiques permettant la transmission d'informations entre deux neurones. Un neurone libère des peptides tandis qu'un second va capter le peptide grâce à un récepteur (R) spécifique, permettant ainsi d'assurer la transmission d'informations dans le cerveau. Notre modèle de recherche est celui d'un peptide exprimé majoritairement dans une population neuronale dont les projections touchent de nombreuses aires cérébrales impliquées dans la prise alimentaire, la réponse au stress, le sommeil et d'autres fonctions sensori-motrices, telles que l'apprentissage et la mémorisation. La distribution de ce peptide est très conservée chez les mammifères, notamment chez les rongeurs et l'homme. Ce peptide peut se lier à deux récepteurs que nous nommerons ici pour plus de simplicité R1 et R2. Ces deux récepteurs ont été retrouvés chez l'Homme alors qu'un seul récepteur, R1, est présent chez la souris. Des études d'association de gènes ont permis de proposer le gène codant pour le récepteur R2 comme gène candidat dans des pathologies comme l'obésité infantile, le syndrome de Prader-Willi et des risques de maladie bipolaire. Le gène R1, quant à lui, n'apparaît pas lié à ces pathologies.

Le modèle animal souris a permis d'étudier en détail les caractéristiques fonctionnelles du récepteur R1 et de comprendre par extrapolation son importance et ses potentialités en terme de santé humaine. Le récepteur R2 étant absent chez la souris, sa caractérisation est impossible. Il est donc apparu nécessaire de générer un modèle de souris « humanisée » pour le R2. L'obtention de cette lignée génétiquement modifiée exprimant le gène du récepteur R2 humain a été obtenue avec succès avec une équipe internationale partenaire. Par la suite une lignée exprimant le gène humain R2 (Klhr2) et invalidée pour le gène R1 (ce qui signifie que le gène du récepteur R1 est supprimé) chez la souris, nommée KOR1 a été produite en collaboration avec une autre équipe partenaire. Cette équipe a caractérisé cette lignée de souris comme présentant un phénotype basal non dommageable, ce qui signifie que ces modifications génétiques n'ont pas eu d'incidence sur la reproduction, la fertilité, la natalité, le comportement maternel, la viabilité des individus et les comportements naturels observables par rapport à des souris non génétiquement modifiées (données non publiées à ce jour).

C'est donc cette lignée de souris invalidée pour le récepteur R1 et possédant le récepteur R2 humain (Klhr2/KOR1) qui sera utilisée pour ce projet.

L'objectif de notre projet étant de caractériser les effets du récepteur R2, nous utiliserons d'une part des tests comportementaux reconnus dans la littérature (anxiété, dépression, motricité et mémorisation), mais également des tests permettant de mesurer des paramètres physiologiques (glycémie, leptine). Pour mener à bien ce projet, il sera nécessaire de recourir à 720 souris.

Nous avons conçu notre plan expérimental dans le souci de la règle des 3R.

- Le remplacement absolu du modèle *in vivo* n'est pas envisageable compte tenu des objectifs du projet tels que les études comportementales et les mesures physiologiques qui ne peuvent être remplacées par des techniques *in vitro*.

- Nous avons réduit nos effectifs tout en conservant un nombre suffisant pour obtenir des résultats statistiques exploitables, robustes et valables.

- Le raffinement de notre projet s'effectue à partir de la naissance des souris et tout au long des procédures expérimentales. Cela débute par la reproduction et le maintien des animaux dans une animalerie conventionnelle et agréée avec le personnel formé et habilité et le respect de la taille d'hébergement en fonction du nombre d'animaux. Des dispositifs d'enrichissement de milieu (un igloo et carrés de ouate compressée) sont présents dans toutes les cages. Durant la phase expérimentale, le personnel technique habilité et formé, veillera à l'application de procédures visant à minimiser toute souffrance ou stress (habituation à la manipulation, examen, points limites...), réalisera les tests et notera toutes remarques pertinentes durant ou après la réalisation des tests expérimentaux et devra en cas de nécessité pratiquer une euthanasie d'urgence à la fin des procédures et en cas de besoin si atteinte de points limites.

Les résultats obtenus sur ce modèle unique, génétiquement modifié et non caractérisé jusqu'à présent, permettront de mieux comprendre le rôle des deux récepteurs R1 et R2 dans différents comportements physiologiques et pathologiques et pourraient ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques et permettre de proposer des approches pharmacologiques innovantes directement liées au traitement de l'anxiété et/ou de la dépression.

7116. L'examen de la composante vasculaire est fondamental pour la compréhension des processus pathologiques (plaque d'athérome et thrombus vasculaire) et leurs conséquences (crise cardiaque et accident vasculaire cérébral). Les techniques d'imagerie dynamique sont de plus en plus rapides et précises et autorisent un suivi longitudinal du petit animal, respectant ainsi la règle des 3R. Parmi celles-ci, les nouvelles générations de Micro-Scanners haute résolution pour petit animal vivant offrent une possibilité d'acquisition rapide, non invasive (faibles doses) et à une très haute résolution. Très récemment (2014), sont apparus des produits de contraste vasculaire de dernière génération, non létaux et théoriquement compatibles avec des résolutions poussées.

Le but de ce projet : tester et valider différents produits de contraste vasculaire de dernière génération non létaux (nanoparticules fonctionnalisées) chez la souris permettant une mise en évidence immédiate par imagerie moléculaire des thrombi carotidiens par Micro-CT haute résolution.

Les expériences seront effectuées sur des souris anesthésiées. Après exposition des carotides et formation de thrombi non occlusifs, puis injection intraveineuse d'un agent de contraste, les souris sont ensuite examinées par imagerie dynamique en scanner X haute résolution.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum, 30 souris seront nécessaires en fonction des effets observés, ce qui permettra d'envisager une étude adéquate sur le plan statistique.

La formation de thrombi carotidiens et leur suivi *in vivo* par imagerie n'ont jamais été expérimentés chez l'animal. Le suivi par imagerie de la cinétique de formation de ces thrombi présente une biologie complexe que l'on ne sait pas reproduire par ingénierie actuellement et dont la complexité ne peut être mimée *in vitro* ou *in silico*. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

7117. Le lithium, traitement régulateur de l'humeur, est prescrit chez les patients souffrant de maladie bipolaire. Malgré une efficacité certaine, le lithium peut être à l'origine d'une toxicité neurologique grave à titre de convulsions, coma, voire de décès. Trois types d'intoxications sont décrits chez l'homme, classés selon leur sévérité, du moins grave au plus grave : l'intoxication aiguë du sujet non traité, l'intoxication aiguë du sujet préalablement traité et le surdosage progressif au cours d'un traitement au long cours. Actuellement, aucun marqueur biologique capable de prédire cette toxicité neurologique n'est connu, et nul ne sait pourquoi les symptômes sont plus ou moins sévères selon le type d'intoxication.

C'est pourquoi, ce projet cherche à 1- mettre au point, chez le rat Sprague-Dawley, une étude comparative des concentrations sanguines et cérébrales du lithium en fonction du temps selon des modalités d'administration mimant les 3 circonstances différentes d'intoxication chez l'homme. 2- Puis, à analyser principalement les effets du lithium sur le système nerveux et le comportement, mais également ses effets sur la respiration, le métabolisme, la circulation sanguine et la physiologie rénale, et de les corrélérer aux concentrations précédemment obtenues. 3- Enfin, à caractériser les principaux mécanismes de transport cérébral du lithium et leur contribution à sa toxicité neurologique. La réalisation de ces 3 objectifs permettra de mieux comprendre les différents types d'intoxication au lithium observés chez l'homme, mais surtout de les prévenir ou d'en permettre une meilleure prise en charge.

Afin que ce projet respecte au mieux l'éthique animale, 1- nous réduirons le nombre d'animaux utiles en évitant de répéter les études déjà rapportées dans la littérature, en déterminant un nombre minimal statistique de rats à utiliser (N=4 par groupe, pour la majorité de nos procédures), et en réutilisant des animaux d'une procédure à une autre. 2- nous atténuerons voire supprimerons la douleur, la souffrance et/ou l'angoisse des animaux en ayant notamment recours à une anesthésie générale avant tout geste invasif, 48 heures minimum de récupération après une chirurgie, un traitement post-opératoire, une prise en charge adaptée des éventuelles complications post-opératoires, et des procédures d'euthanasie appropriées. 3- en revanche, nous serons dans l'incapacité de remplacer notre modèle animal par tout autre modèle (cellulaire, informatique, ...); dans un premier temps pour des raisons de comparabilité avec la littérature, la quasi-totalité des études rapportées étant réalisée chez l'animal; et dans un second temps car nos procédures mettent en jeu des approches intégrées sur animal entier et des explorations fonctionnelles sur animal vigile qui ne peuvent pas être substituées par des approches *in vitro* ou *in silico*.

En définitive, 768 rats Sprague-Dawley mâles seront nécessaires à l'aboutissement de ce projet.

7118. Le but du projet est de déterminer l'impact de la modification d'un gène sur les mécanismes de régulation des graisses dans l'organisme, notamment dans le cadre d'un régime enrichi.

Il constitue une première approche dans la recherche de cibles d'intérêt pour la mise au point de potentiels traitements de maladies liées au diabète ou à l'obésité.

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

**REPLACEMENT** : Ce projet visant à étudier un mécanisme physiologique complet, l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Les animaux seront analysés dans un premier temps en étant nourris avec une diète classique adaptée au maintien des animaux, puis ils seront nourris avec une diète enrichie en graisse jusqu'à la fin du protocole.

Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature.

Cette séquence de tests permet de mettre en place un ensemble de données visant à déterminer l'impact de cette mutation sur la capacité de réguler le métabolisme des lipides; sous un régime standard, mais aussi dans le cadre d'un enrichissement du régime en sucres et en graisse.

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

Ces lignées ne concerneront donc que des phénotypes non dommageables et une étude rétrospective sera mise en place pour chacune. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux, ainsi qu'une pesée hebdomadaire.

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

Une cohorte de 68 animaux sera utilisée afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude, réparties en 4 groupes de 17 souris. Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

Ce projet pourra s'appliquer à 2 lignées différentes par an, pour un nombre total d'animaux de 136 souris par année.

Cette autorisation est demandée pour une période de 5 ans ce qui peut inclure l'utilisation théorique d'un maximum de 680 animaux.

Il convient de préciser que tous les efforts seront faits pour réduire autant que possible ce nombre, tout en assurant une analyse robuste des paramètres mesurés durant le protocole.

7119. Le but de ce projet est de tester de nouveaux candidats médicament qui pourraient être utilisés pour soigner ou réduire de façon significative les symptômes de patients souffrants de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD).

DMD est une myopathie d'origine génétique sévère affectant généralement les garçons (1 sur 3500). Les premiers symptômes apparaissent aux alentours de l'âge de 3 ans, et l'espérance de vie est en moyenne de 25 ans.

REMPLACEMENT : Les composés seront testés sur le modèle murin mdx et le contrôle correspondant. Les souris mdx reproduisent certains éléments de la pathologie humaine, ne pouvant pas être testés *in vitro*. Cependant, un remplacement partiel a été réalisé. En effet, les candidats médicaments sont identifiés par criblage de nombreux composés sur des cellules en culture.

La validation des composés issus de ce criblage passe ensuite par une étape préclinique, par le biais d'une administration dans le modèle souris mdx.

Il s'agit d'une étape indispensable permettant de confirmer leur effet et de poursuivre leur développement pour obtenir un potentiel traitement.

Au préalable, ces composés auront été testés par notre partenaire pour exclure une éventuelle toxicité ou effet indésirable. Par ailleurs, le développement de ces traitements utilise autant que possible des véhicules et solvants déjà utilisés en clinique humaine.

Déroulement du projet et RAFFINEMENT : Les souris seront traitées par injection intrapéritonéale (i.p.) pendant 4 semaines. La fréquence d'injections dépendra de la vitesse d'élimination du composé, sans dépasser 2 injections par jour, 5 jours par semaine.

Les zones ventrales injectées seront alternées afin de limiter toute douleur éventuelle.

Tout signe de douleur ou de souffrance sera traité de façon appropriée en fonction de la sévérité (par administration d'analgésiques ou par l'euthanasie de l'animal pour raison éthique).

A la fin du traitement, les souris seront analysées au niveau de leurs capacités musculaires par des tests d'agrippement et par un test permettant de mesurer la force de certains muscles *in situ* lors de contraction musculaire.

Par la suite, du sang sera prélevé et différents tissus seront congelés afin d'être analysés et d'en tirer un maximum d'information.

Un maximum d'un test *in vivo* sera pratiqué par jour et par souris.

REDUCTION : La variabilité de la mutation mdx utilisée nous contraint à utiliser 15 animaux par groupe, de même sexe, pour permettre une puissance d'analyse suffisante tout en répondant aux impératifs de réduction et de raffinement liés aux problématiques éthiques. Cet effectif nous permet de mettre en œuvre une approche statistiquement significative au vu des données préalablement générées au sein de notre structure.

Un protocole contiendra de 3 à 8 groupes expérimentaux, permettant de disposer de contrôles nécessaires pour une évaluation statistiquement fiable, tout en autorisant le test d'un à cinq composés en simultané, afin de réduire le nombre de souris utilisées comme contrôle.

Un maximum de 120 animaux sera donc utilisé dans un protocole. Selon les résultats obtenus et le nombre de composés présentant une efficacité dans les tests cellulaires, nous souhaitons effectuer ce protocole un maximum de 4 fois par ans sur l'ensemble de la durée du projet.

En prenant l'ensemble de ces effectifs maximum, le projet dans son ensemble pourrait nécessiter l'utilisation d'un maximum théorique de 2400 animaux. Néanmoins, tous les efforts seront fournis pour réduire autant que possible le nombre d'animaux, en mutualisant les groupes contrôles notamment.

7120. L'ataxie de Friedreich est une pathologie humaine d'origine génétique entraînant des troubles cardiaques et neurologiques majeurs.

L'origine génétique est documentée et se centre sur l'expression d'une protéine : la Frataxine (FXN).

La perte d'expression de cette protéine est ainsi responsable de troubles cellulaires entraînant la pathologie.

Afin de mettre en place des thérapies pour cette pathologie, des modèles murins ont été développés de manière ciblée, visant à isoler les différentes aires thérapeutiques (cardiaque, système nerveux central...).

Dans ce projet, nous nous intéresserons à une mutation ciblée du gène permettant la synthèse de FXN dans certaines cellules du système nerveux central.

Ces animaux présentent une mortalité liée à l'apparition de crises épileptiques à partir de l'âge de 20 semaines. Par ailleurs, des déficits de coordination motrice apparaissent de manière précoce dès la 4ème semaine et s'empirent avec l'âge.

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

Dans ce nouveau projet, nous chercherons donc à traiter les symptômes observés chez les animaux mutants afin d'empêcher la dégradation de leur état, classiquement observée. Le traitement consistera dans l'injection de vecteur visant à exprimer la frataxine dans les cellules déficientes.

Quatre groupes d'animaux seront utilisés :

- 8 animaux témoins non traités, injectés uniquement avec le véhicule du vecteur
- 8 animaux mutés non traités, injectés uniquement avec le véhicule du vecteur
- 12 animaux mutés traités avec une injection du vecteur à visée thérapeutique (1E10 vg/kg)
- 12 animaux mutés traités avec une injection du vecteur à visée thérapeutique (5E13 vg/kg)

Les doses de vecteur ont été choisies dans une étude préalable, dans l'étude pilote. La dose faible permettait un retour à une expression normale dans le cœur et une expression modérée dans les ganglions des racines dorsales. La dose plus forte devrait permettre une expression restaurée dans ces ganglions avec une meilleure expression.

Le protocole se poursuivra jusqu'à l'âge de 15 semaines, soit 12 semaines après le traitement.

Cette période permettra de mettre en évidence les effets potentiellement thérapeutiques, face aux animaux non traités présentant des symptômes marqués mais non délétères.

Ainsi, nous éviterons un risque de souffrance/mortalité des animaux recevant le véhicule.

Plusieurs évaluations des capacités motrices seront effectuées durant le protocole, ainsi qu'un électromyogramme en début et en fin de protocole.

**RAFFINEMENT** : les tests seront effectués sous anesthésie pour minimiser autant que possible la souffrance ou le stress des animaux.

Un suivi quotidien de l'état des animaux sera aussi assuré pour s'assurer de leur bien-être, ainsi qu'un suivi de poids hebdomadaire. La voie d'administration du vecteur thérapeutique est encore en cours de caractérisation, et l'injection pourra être effectuée par voie intra-veineuse, intra-thécale (au niveau des vertèbres lombaires) ou intra-cérébro-ventriculaire (au niveau du cerveau). Les trois procédures seront présentées mais une seule sera effectuée durant le protocole, lorsque les résultats de l'étude préliminaire actuellement en cours nous auront permis de conclure sur la voie efficace pour la propagation du virus au niveau des zones d'intérêt thérapeutiques (cortex, ganglions dorsaux).

**REDUCTION** : Ce protocole utilisera donc 40 animaux, ce qui constitue un nombre minimum pour pouvoir conclure, tout en étant réduit afin de satisfaire aux exigences de réduction en vigueur. En effet, la variabilité au niveau moléculaire de l'expression du vecteur nous force à utiliser plus d'animaux dans les groupes traités. Les niveaux d'expression mesurés dans les tissus permettront par ailleurs de mettre en relief les données obtenues *in vivo*.

**REMPLACEMENT** : Il n'est pas par ailleurs possible d'utiliser d'autre modèle que le modèle animal pour caractériser l'efficacité thérapeutique de ce composé.

Dans un second temps, et selon les résultats obtenus, un second protocole avec un second candidat thérapeutique pourrait être réalisé, avec de nouveau 40 souris, pour un total de 80 animaux utilisés dans l'ensemble de l'étude.

7121. La mortalité due au cancer a diminué au cours des vingt dernières années. Sur la période 2005-2009, le cancer reste néanmoins la première cause de mortalité chez l'homme et la seconde chez la femme. En 2015, 149 500 décès par cancer ont été estimés. 84 100 chez l'homme et 65 400 chez la femme.

La prise en charge du cancer passe par des étapes de chimiothérapies anticancéreuses. Les médicaments utilisés à cet effet sont efficaces mais entraînent de nombreux effets indésirables (Fatigue, nausées, pertes des cheveux...). Ces effets indésirables peuvent être très handicapants, ils limitent aussi la dose maximale qu'il est possible d'injecter et donc de fait l'efficacité des traitements : Chez un patient ayant beaucoup d'effets indésirables, les médecins devront diminuer la dose, il y aura des risques de voir une diminution de l'efficacité.

Notre but est de cibler les médicaments existants en les encapsulant dans des nanoparticules répondeuses aux ultrasons. Ces nanoparticules injectées par voie intraveineuse vont permettre de confiner le médicament encapsulé à l'intérieur des vaisseaux sanguins et donc d'éviter sa dispersion dans l'organisme ce qui entraîne les effets indésirables. Un faisceau d'ultrasons sera focalisé sur la tumeur, lorsque les nanoparticules passeront à ce niveau elles libéreront le médicament de manière localisée dans la tumeur. L'objectif est d'avoir une concentration plus importante à l'intérieur de la tumeur tout en ayant une concentration plus faible dans les autres organes pour avoir une efficacité augmentée tout en ayant moins effets indésirables. Pour cela il nous faut mener des études de pharmacocinétiques et de bio-distribution chez la souris. Le but est de mesurer la concentration en médicament dans le sang et les organes à différents temps pour le médicament libre, le médicament encapsulé dans les nanoparticules, le médicament encapsulé avec l'application d'ultrasons. La séquence d'ultrasons optimale doit aussi être étudiée pour avoir le système le plus efficace possible.

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de la pharmacocinétique, de la bio-distribution d'un principe actif et de son efficacité antitumorale. Durant leurs transports 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 les organes dont la tumeur sur animal entier pour tenir compte de ces phénomènes.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement 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 et de bio-distribution nous utiliserons 644 souris sur 2 ans. Des points limites d'expériences ont été identifiés en amont de la mise en place de ce projet afin de limiter la douleur et le mal-être des animaux. Des procédures antalgiques seront mises en place lors de la greffe des cellules (anesthésique local et antalgique) et ensuite si nécessaire en fonction de l'état de bien-être des animaux. La tolérance des animaux déterminera l'arrêt de l'expérience.

7122. Des études ont montré que le système nerveux périphérique pouvait réguler le système immunitaire (SI). De quelle façon ? La libération des neurotransmetteurs (tels que l'acétylcholine, l'adrénaline ou la noradrénaline) lors de la stimulation de nerfs périphériques peut agir directement sur les cellules du système immunitaire. Il a ainsi été montré que les organes lymphoïdes

secondaires reçoivent une innervation importante de nerfs périphériques. Par ailleurs, on peut détecter l'expression de récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du système immunitaire. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques dans le but de modifier l'activité du système immunitaire est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation de nerfs périphériques est déjà utilisée pour le traitement de maladies comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50000 patients dans le monde sont implantés avec des micro-stimulateurs. Les effets de ces électrostimulations du nerf vague sont actuellement recherchés dans des maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde. En effet, il a été montré que, dans des modèles d'inflammation chez la souris, l'électrostimulation du nerf vague induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats suggèrent donc que la stimulation du système nerveux sympathique pourrait prévenir le choc septique chez l'animal.

Le but de notre projet est d'évaluer la possibilité de prévenir le diabète de type 1 (DT1) (maladie inflammatoire auto-immune) par stimulation du nerf pancréatique chez la souris NOD. Cette souche de souris (non transgénique) a été sélectionnée car elle développe spontanément le DT1.

Les différentes étapes du projet consisteront à implanter une électrode de stimulation au niveau du nerf pancréatique et à réaliser une électrostimulation pour:

1- Déterminer les conditions de stimulation électrique du nerf pancréatique optimales à l'inhibition développement du DT1 chez la souris NOD (procédure n°1)

2- identifier la nature des neurotransmetteurs mis en jeu lors de l'inhibition du DT1 induite par l'électrostimulation des nerfs pancréatique (procédure n°2)

Le nombre total de souris utilisées pour ce projet est de 216. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment en :

- enrichissant les cages des animaux ;

- administrant des analgésiques dérivés de la morphine ;

- mettant en mise en place des points limites reposant notamment sur des mesures de glycémie.

Enfin, l'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire.

7123. La dépression est un problème de santé publique majeur. Elle est l'origine de l'immense majorité des cas de suicide. Si les antidépresseurs actuels sont efficaces, ils demeurent encore imparfaits. Notamment, un délai d'action de plusieurs semaines est nécessaire pour obtenir un effet de ces traitements. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour obtenir un effet antidépresseur rapide est donc une priorité.

Dans ce cadre il a été montré que la kétamine était une molécule intéressante. Cette molécule est utilisée comme anesthésique, toutefois son utilisation à des doses plus faibles a montré un effet antidépresseur rapide. Cette particularité tient certainement au mécanisme d'action de la Kétamine qui est un antagoniste du récepteur NMDA du glutamate. Ce mécanisme est totalement différent de ceux des antidépresseurs actuels qui ciblent essentiellement le catabolisme des monoamines (sérotonine et noradrénaline, essentiellement).

La compréhension fine des mécanismes d'action de la kétamine reste encore largement à étudier. En effet, ceci pourra certainement ouvrir des perspectives pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Comme tous les systèmes de neurotransmissions sont liés, nous testerons les conséquences de l'application de Kétamine au regard d'une la voie anatomique majeure impliquée dans la dépression : la voie cortex médian préfrontal - noyau du raphé. Cette voie implique une libération de sérotonine dans le cortex. Une étude menée au laboratoire a montré que la kétamine augmente cette libération.

Nous chercherons à évaluer si l'effet antidépresseur de la kétamine passe par cette voie anatomique. Nous en inhiberons l'activité électrique et évaluerons les conséquences neurochimiques (libération de sérotonine) et comportementales (tests prédictifs de l'état anxio dépressif des animaux).

Pour l'ensemble de ce projet, 540 souris seront utilisées, en accord la règle des 3R. Remplacement : dans l'état actuel des connaissances, l'animal, dans son entité, est la seule alternative à l'étude des troubles de l'humeur. Réduction : chaque animal sera utilisé comme son propre contrôle ceci permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux nécessaire. Par ailleurs ce nombre a été évalué par une analyse de puissance. Raffinement : des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés dès que nécessaire de manière à ce que les souris soient dans conditions optimales.

Globalement, l'ensemble de ce projet permettra une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu pour obtenir un effet antidépresseur rapide. Ceci aidera à identifier de nouvelles cibles pour le développement d'antidépresseurs à action rapide.

7124. La présence de métastases chez les patients est la principale cause de décès par cancer. En effet dès lors que les cellules tumorales ont envahi les organes vitaux l'espérance de vie devient très limitée. Le cancer du côlon est le troisième cancer le plus meurtrier à travers le monde et l'organe principal de développement métastatique est le foie. Seuls 5% des patients diagnostiqués avec un cancer du côlon métastatique survivront dans les 5 ans, il est donc primordial de trouver de nouvelles thérapies efficaces pour ces patients.

Nous avons montré qu'un composé (GNS561), décrit comme un inhibiteur rétroviral, avait un impact fort *in vitro* sur la survie des cellules issues de métastases hépatiques de patients porteurs d'un cancer du côlon. Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, nous utiliserons un modèle de xénogreffes chez la souris immunodéprimée qui consiste à injecter les cellules tumorales dans la rate des souris et suivre la colonisation dans le foie. La croissance tumorale sera suivie par imagerie non invasive de bioluminescence. Cette imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les protocoles expérimentaux car chaque animal est son propre

contrôle, puisqu'il n'y a pas de mise à mort à chaque temps d'imagerie. En outre, l'imagerie permet de raffiner le projet puisqu'elle fournit des informations complémentaires aux techniques classiques ex-vivo.

Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance régulière et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 65 souris sur une durée de 5 ans.

7125. L'immunociblage de tumeurs à l'aide d'anticorps monoclonaux est une option thérapeutique qui a émergé il y a une quinzaine d'années. Actuellement 30 anticorps médicaments sont sur le marché (dont la moitié est utilisée dans le cancer), et 500 anticorps sont en essai clinique en oncologie. Notre projet porte sur l'étude d'anticorps thérapeutiques, ciblant les récepteurs de la famille HER (récepteur à l'EGF) ou leurs ligands impliqués dans le développement de nombreux cancers (dont le cancer du pancréas) ainsi que dans la résistance thérapeutique. Pour cela, nous utiliserons un modèle de xéno greffe intra-pancréas, qui permet de tester l'effet de nos anticorps seuls ou associé à la chimiothérapie standard (gemcitabine). La prolifération tumorale sera suivie par imagerie non invasive de bioluminescence. Cette imagerie permet de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les protocoles expérimentaux car chaque animal est son propre contrôle, puisqu'il n'y a pas de mise à mort à chaque temps d'imagerie. En outre, l'imagerie permet de raffiner le projet puisqu'elle fournit des informations complémentaires aux techniques classiques ex-vivo.

Dans la présente étude, nous voulons savoir si une association d'anticorps sera plus efficace que les anticorps utilisés seuls dans le cancer du pancréas pour lequel aucune thérapie n'existe. Puis cette association sera comparée à la chimiothérapie standard utilisée dans cette pathologie. Deux types de lignées cancéreuses seront étudiés et un nombre de 40 animaux (4 groupes de 10 souris) sera utilisé par expérience. Le règle des trois R sera respectée en réalisant des tests *in vitro* qui nous permettront de sélectionner les traitements les plus pertinents à tester chez les animaux et de réduire le nombre de souris.

Les animaux utilisés feront l'objet d'une surveillance régulière et leur milieu sera enrichi à l'aide de litière mélangée à des copeaux, ainsi que de briques de peuplier.

Pour l'ensemble de ce projet, nous avons prévu un nombre de 220 souris sur une durée de 5 ans.

7126. L'ostéoporose et l'arthrose sont deux maladies osseuses liées au vieillissement. L'ostéoporose se caractérise par une diminution de la qualité et de la quantité d'os. L'arthrose inclut une disparition du cartilage et une modification de l'os sur lequel il repose. Ces dernières peuvent précéder les lésions du cartilage, suggérant que le contrôle de l'intégrité osseuse est important pour la physiologie des articulations. Le tissu adipeux de la moelle osseuse (BMAT) a peu été étudié jusqu'à présent et ses fonctions demeurent très mal connues. Des données récentes suggèrent qu'il contribue à réguler l'intégrité de l'os. Toutefois, son rôle dans l'ostéoporose est encore mal connu et celui dans l'arthrose n'a jamais été investigué.

Nous pensons que le tissu adipeux de la moelle osseuse pourrait jouer un rôle dans les altérations de l'os associées à l'ostéoporose et l'arthrose. La scipin est une protéine codée par le gène *bcl2* qui a un rôle clef dans l'adipogenèse. Les patients dont le gène *bcl2* est muté ont une lipodystrophie congénitale généralisée. Ils présentent une absence de tissu adipeux, notamment celui de la moelle osseuse et ont des problèmes osseux. Les souris invalidées pour le gène *bcl2* récapitulent le phénotype observé chez l'Homme. Nous voulons déterminer si l'absence de scipin chez la souris est associée à des modifications de l'intégrité osseuses qui pourraient se révéler au cours du vieillissement et/ou lors de maladies osseuses liées au vieillissement comme l'arthrose et l'ostéoporose.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 776 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

7127. La neurogenèse du bulbe olfactif représente un modèle principal pour étudier les différents aspects de la génération des neurones tels que la biologie des cellules souches, la détermination neuronale, la migration et la différenciation cellulaire. La neurogenèse adulte présente un potentiel intéressant pour des approches de thérapie cellulaire dans des modèles de maladies neurodégénératives. L'objectif de ce projet est de déterminer les mécanismes qui contrôlent les différentes étapes de la neurogenèse et donc d'identifier des gènes impliqués dans ces processus et de tester leur fonction *in vivo* dans le cerveau de souris, c'est à dire en condition physiologique. La neurogenèse est un processus qui dépend de l'environnement cellulaire dans le tissu nerveux et de l'environnement olfactif dans lequel évolue l'animal. L'ensemble de ces critères fait qu'il est indispensable d'étudier ce processus *in vivo* chez l'animal et nous avons choisi dans ce projet d'utiliser comme modèle la souris. 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. De plus, l'observation chronique en microscopie de la même souris permet de réduire de façon importante le nombre d'animaux utilisés. Ainsi ce projet utilisera 190 souris transgéniques durant les 5 prochaines années. Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements enrichis pour leur permettre de se comporter normalement. Les animaux sont élevés en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et environnemental des animaux 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.

7128. Les traitements anticancéreux conventionnels ont une action directe sur les cellules tumorales sans stimulation du système immunitaire mais au prix d'une toxicité sur les cellules saines. Par ailleurs, ils ne préviennent pas des rechutes métastatiques liées à l'existence de cellules résistantes. Certains traitements anti-cancéreux peuvent induire une mort dite immunogène *in vitro* en déclenchant une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. Ceci concorde avec l'observation d'infiltration en intra-tumoral de cellules du système immunitaire : les globules blancs. L'une des voies majeures utilisée par les traitements immunogènes pour mobiliser le système immunitaire contre le cancer est le stress du réticulum endoplasmique, composant cellulaire impliqué dans la synthèse des protéines. Le stress du réticulum endoplasmique est un phénomène physiologique présent chez tous les mammifères, permettant la survie cellulaire en cas de situations cytotoxiques et survenant dans tous les organes d'une espèce. Ce stress se déclenche en cas de synthèse de protéines anormales et est médié par trois protéines majeures. Son objectif est d'arrêter la synthèse protéique jusqu'à destruction complète des protéines anormales. Il permet ainsi la survie de l'espèce. Notre hypothèse est que ce stress a un rôle majeur dans la lutte anti-cancéreuse. Le stress du réticulum endoplasmique est un phénomène physiologique présent chez tous les mammifères, permettant la survie cellulaire en cas de situations cytotoxiques et survenant dans tous les organes d'une espèce. Ce stress se déclenche en cas de synthèse de protéines anormales et son objectif est d'arrêter la synthèse protéique jusqu'à destruction complète des protéines anormales. Il permet ainsi la survie de l'espèce. Ce stress est un processus multiparamétrique impliquant des sécrétions humorales et des répercussions immunitaires non modélisables ailleurs que dans un être vivant entier. On ne peut donc se contenter de l'étudier uniquement *in vitro*, il est indispensable d'avoir recours à l'animal de laboratoire. Notre hypothèse est que ce stress a un rôle majeur dans la lutte anti-cancéreuse. La compréhension de ce phénomène et sa reproduction *in vivo* ouvrirait la possibilité d'un traitement anti-cancéreux efficace chez l'homme.

Pour ce faire, 180 souris immunodéprimées, adultes seront greffées en sous-cutané, avec des cellules tumorales humaines d'ostéosarcome non modifiées ou modifiées génétiquement pour devenir fluorescentes en cas d'activation des protéines du stress du réticulum endoplasmique. Après obtention des tumeurs, chaque groupe de souris recevra en intra-tumoral, une injection de placebo ou un traitement induisant le stress du réticulum endoplasmique ou un traitement immunogène. Vingt-quatre heures après l'injection, les tumeurs seront récupérées, conservées et des coupes fines seront réalisées. Une analyse microscopique permettra de déterminer l'activation ou non des protéines du stress du réticulum endoplasmique sous traitement immunogène comparé à un traitement placebo ou à un traitement induisant le stress.

Le nombre de souris a été calculé rigoureusement et mathématiquement. Seul le nombre minimal de souris sera utilisé dans l'étude. Tout sera mis en œuvre pour réaliser le projet éthiquement et sans souffrance, sans douleur et sans angoisse pour les souris.

Les souris seront logées dans des cages grandes, propres, nettoyées et dans un environnement enrichi avec arrivée et renouvellement de l'air régulier, température et éclairage contrôlés afin de respecter le cycle physiologique des souris. De l'eau potable et de la nourriture fraîche seront toujours disponibles.

Le stress des animaux sera évalué quotidiennement par des échelles d'hétéroévaluation (relevant des signes indirects de stress : perte de poids, pelade, agressivité, prostration, hypotonie, agitation, les petits yeux, les oreilles en arrière...). Des mesures seront prises pour limiter le stress : plusieurs souris par cage pour un élevage social (mais maximum 5 par cage, exclusion des souris agressives), apport de coton et de maison en carton pour faire des aires de repos, apport nutritif (Diet Gel), animaux hébergés au calme. Les interventions chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale à l'écart des animaux hébergés et par des personnes expérimentées.

7129. Notre laboratoire, qui est un centre national de référence et centre collaborateur OMS, a développé une thématique importante de recherche sur les maladies infectieuses en particulier celles en relation avec les abcès cérébraux. Les abcès cérébraux sont des infections potentiellement mortelles, entraînant souvent des séquelles graves. La prise en charge médicale reste empirique en raison d'un manque de connaissance approfondie des microorganismes responsables de cette condition. Dans la plupart des laboratoires microbiologiques, le diagnostic des abcès cérébraux est basé sur la culture du pus recueilli chirurgicalement à partir de ces abcès. Malheureusement, cette procédure a de nombreuses limites et ne permet l'identification que d'une petite partie de la population microbienne en cause. L'amplification par PCR et le séquençage du gène codant la fraction 16S de l'ADN ribosomal ont récemment été utilisés pour surmonter les limites de la culture, et ont démontré leur efficacité dans la documentation des infections bactériennes. Cependant, cette procédure présente un degré de discrimination limité en cas d'infection polymicrobienne.

Des études métagénomiques de flores complexes de l'homme, basées sur une combinaison de PCR, clonage et séquençage des produits de PCR se sont avérées utiles pour évaluer la diversité bactérienne des flores dentaires, vaginales et intestinales. Nous avons appliqué cette technique à des échantillons d'abcès cérébraux pour étudier la flore associée à cette maladie. Dans une première étape, nous avons réalisé une enquête (exploration) en utilisant la culture et les techniques moléculaires ce qui nous a permis de détecter



pour la première fois dans un abcès cérébral humain, l'archée méthanogène *Methanobrevibacter oralis*. Donc nous pensons que cette archée pourrait être impliquée dans l'apparition de cet abcès mais ceci n'a jamais été explicité ni prouvé expérimentalement. Notre projet consistera à inoculer en intracérébrale les souriceaux nouveau-nés par cette archée et aussi par 3 autres pathogènes retrouvés dans l'abcès étudié (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Clostridium hatewayi*), afin de mieux comprendre l'impact que pose la présence de cette archée dans les abcès cérébraux.

Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées, eau et aliments à volonté. Pour le confort des souris, un enrichissement sera mis en place à l'aide du matériel de nidification pour réduire toute angoisse. Les souris seront hébergées une femelle gestante par cage puis une portée par cage avec la maman qui reste à la fin de l'expérience. Par ailleurs les animaux seront suivis bi-quotidiennement pour déceler tout signe d'inconfort et de permettre une action rapide en cas d'atteinte des points limites.

Une seule portée de souriceaux sera inoculée pour chaque groupe et nous arrêterons le projet au premier groupe (groupe *Methanobrevibacter oralis*) si l'inoculation de cette archée ne donne pas d'abcès cérébraux.

Ce projet comportera 9 groupes de souriceaux. Chaque groupe contient à peu près 10 animaux, soit au total 10 à 15 femelles gestantes et 90 souriceaux seront utilisés au cours de ce projet.

Cette expérimentation sera réalisée dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3.

7130. « *Mycobacterium canettii* » est une bactérie 'tuberculeuse' rare qui présente des différences comparées à *M. tuberculosis* responsable de la tuberculose humaine. En effet, elle se présente sous l'aspect de colonies lisses en culture contrairement aux colonies rugueuses de *M. tuberculosis*. D'un point de vue épidémiologique, elle est majoritairement isolée dans la Corne de l'Afrique. Cliniquement, elle donne des atteintes moins persistantes et moins virulentes, cependant nous ne connaissons ni son réservoir ni son mode de transmission à l'homme et aucun cas de transmission inter humaine n'a été rapporté. Son traitement est calqué sur celui de *M. tuberculosis* et elle est naturellement résistante à l'antibiotique pyrazinamide.

Seuls 93 cas d'infection chez l'homme ont été rapportés, dont 44 ont eu une forme pulmonaire, les autres montrant la possibilité d'une diffusion large dans le corps humain avec une forte proportion d'atteinte des ganglions lymphatiques (32% des cas). A noter cependant que du fait de l'origine géographique des cas rapportés, nous disposons que de très peu de détails cliniques. En particulier, nous ne connaissons pas le degré de sévérité des atteintes. Un cas de localisation œsophagienne et un autre intra-abdominal sont mentionnés sans que nous n'en sachions davantage. Il est possible que des portes d'entrées pulmonaires et/ou digestives soient impliquées ce qu'il est nécessaire d'élucider pour mieux comprendre, diagnostiquer et donc prévenir et traiter cette maladie.

Dans ce projet, nous voulons décrire les principales étapes du développement de cette maladie en commençant par identifier sa ou ses voies de contamination et en suivant sa dissémination vers différents organes. Par la suite, nous évaluerons sa pathogénicité et sa virulence en la comparant à une infection par *M. tuberculosis*. Pour cela, nous mettrons au point un modèle murin d'infection expérimentale par *M. canettii*. Nous testerons la voie d'inoculation respiratoire ainsi que la voie digestive. Pour la voie respiratoire, nous exposerons les animaux à un aérosol d'une solution contenant la bactérie. Pour la voie digestive, nous procéderons à une administration par gavage oro-oesophagien à l'aide d'une sonde à gavage souple munie d'une extrémité mousse. Pour ces procédures, les animaux ne seront pas sédatisés ni anesthésiés car aucune douleur ou inconfort notable ne sont attendus.

Selon la règle des 3R, le nombre d'animaux sera réduit grâce à un objectif de tout ou rien sur le résultat visant à identifier la voie digestive comme porte d'entrée possible (détection de la bactérie dans les organes profonds). Egalement, un suivi de la cinétique de l'infection par imagerie intravivante de type bioluminescence et fluorescence qui permettra de visualiser la progression au cours du temps des bactéries marquées dans l'organisme d'un même animal vivant. Pour la comparaison de pathogénicité (versus *M. tuberculosis*), le nombre d'animaux sera réduit en ciblant la phase précoce de l'infection. Ainsi, seules 4 périodes post-infectieuses nécessiteront des euthanasies réparties sur 7 jours post-infection. Compte tenu des données déjà disponibles dans la littérature, nous prédisons une faible virulence ainsi nous pourrions réduire à 6 le nombre d'animaux par temps et par groupe nécessaires pour interpréter les différences éventuelles. Nous réduirons à une seule espèce les animaux nécessaires. Dans l'objectif de raffiner, la mise au point des manipulations sera effectuée à l'aide de la souche vaccinale (non pathogène et n'entraînant pas d'inconfort après l'injection) *M. bovis* bacille de Calmette-Guérin (BCG) sur un petit nombre d'animaux. Aucune procédure supplémentaire ne sera mise en œuvre dans l'intervalle qui sépare l'inoculation de l'euthanasie. Tous les animaux seront euthanasiés en fin d'expérimentation correspondant aux 4 temps déterminés ou dès l'apparition d'un point limite. Afin de raffiner également, des prélèvements d'organes et de sang seront effectués en post-mortem immédiat et *M. canettii* sera recherché après conditionnement des tissus ou liquides biologiques en particulier au sein des organes lymphatiques et apparentés, les voies aériennes, le sang, la rate, le foie, la graisse et les selles. Le nombre maximal d'animaux utilisé dans cette étude sera de 132. Les données des animaux témoins inoculés par du PBS seront reprises d'expérimentation précédente permettant de remplacer l'utilisation d'un groupe supplémentaire pour ce projet conformément à la règle des 3R.

7131. Ce projet vise à déterminer l'implication de la voie TSH/T3 hypothalamique dans la reproduction saisonnière. Chez les rongeurs saisonniers, comme les Hamsters syriens (*Mesocricetus auratus*) et sibériens (*Phodopus sungorus*), la régulation de la fonction de reproduction dépend des saisons marquées par des variations de la durée du jour sur 24h appelées photopériode. En conditions de jours courts (hiver, photopériode longue PC), le hamster est au repos sexuel alors qu'en photopériode longue (PL, jours longs, été), il est sexuellement actif. Il existe donc une réactivation de la reproduction lors du passage PC-PL appelée réactivation photopériodique.

Par ailleurs, lorsque le hamster reste de manière prolongée en PC inhibitrice, la reproduction se réactive spontanément alors que le signal stimulateur (PL) est absent. Ce phénomène particulier est appelé réactivation photoréfractaire (PR). La régulation de la

fonction de reproduction (activation/inactivation/réactivation) repose sur des modifications en cascade de l'expression de différents acteurs situés tout le long de l'axe gonadotrope reliant le cerveau aux gonades.

D'après nos résultats et la littérature, parmi les acteurs potentiels se trouvent des messagers hormonaux (TSH, FSH, LH, testostérone), des enzymes (Déiodinase 2) ou encore des neuropeptides (Kisspeptine, RFRP) connus pour jouer un rôle important dans la régulation de l'axe gonadotrope. L'ensemble de ces facteurs régulateurs ont été organisés en une voie moléculaire théorique : activation de TSH et Déiodinase2 puis RFRP/Kiss et FSH/LH-testostérone.

Cependant des résultats récents remettent en cause l'implication de la TSH et de la Déiodinase 2 dans la réactivation photopériodique et photoréfractaire, avec notamment des différences entre les deux modèles de Hamsters. En effet l'activation des gonades ne semble pas toujours corrélée à une modification de TSH ou de la Déiodinase 2.

Notre projet a comme objectif d'inhiber chez les deux espèces les premiers maillons de la chaîne de réactivation théorique (TSH et Déiodinase 2) lors de la réactivation photopériodique (PC-PL) ou photoréfractaire (PC-PR), afin de vérifier leur réelle implication dans ces deux phénomènes. En plus des innovations scientifiques en termes de technique, cette étude complètera les connaissances sur la régulation de la fonction de reproduction ce qui est économiquement pertinent pour faire face aux enjeux agronomiques. En effet, elles permettent l'optimisation de l'élevage agricole d'animaux saisonniers comme le mouton en Europe ou le dromadaire en Afrique du nord. De plus l'amélioration des connaissances dans la régulation saisonnière de la reproduction peut également apporter des informations utiles à l'étude de la puberté chez l'homme car ces deux phénomènes sont assez proches. Cela pourrait contribuer à développer, chez l'homme, de nouvelles stratégies de traitement des maladies de la puberté tel que l'hypogonadisme.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche sur animaux. En termes de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées, car les mécanismes de réactivation de la reproduction font appels à des voies de signalisation complexes à travers différents tissus et organes. Ces voies neuronales et hormonales sont trop complexes pour être reproduites par un modèle *in vitro*. En termes de réduction, nous avons établi un nombre d'animaux à 8 par groupe expérimental pour obtenir des résultats statistiquement valides et nous aurons besoin de 828 Hamsters syriens mâles et 828 Hamsters sibériens mâles au total sur 5 ans. Ce nombre élevé d'animaux s'explique surtout par la nécessité de mener des expériences pilotes étant donné que notre approche et les outils nécessaires n'ont encore jamais été utilisés dans les espèces susmentionnées. En termes de raffinement, le milieu de vie des hamsters sera enrichi avec un nid et un barreau à ronger. Ce projet nécessite une approche invasive (injections dans le cerveau). Une attention particulière sera portée à la réduction de la douleur et du stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques, suivi du score de douleur), d'autant plus qu'un stress excessif ou la douleur prolongée et non traitée risquent d'interférer avec un fonctionnement correct de l'axe gonadotrope.

7132. Les lymphocytes sont des cellules du système immunitaire qui jouent un rôle clef dans la défense contre les tumeurs et les agents infectieux.

Récemment, un nouveau type de lymphocytes a été identifié. Ces cellules vivent non pas dans les organes lymphoïdes (rate et ganglions lymphatiques), mais dans la peau et certains tissus (poumons, intestins). A l'interface entre le corps et le milieu extérieur, ces cellules résidentes des tissus (appelées TRM pour Tissue-Resident Memory cells) fournissent une première réponse contre les agents infectieux et accélèrent l'élimination des pathogènes. Le caractère « résident » de ces cellules, c'est-à-dire leur incapacité à circuler par le sang d'un organe à un autre, représente leur principale caractéristique.

Dans ce projet, nous étudions une nouvelle population de lymphocytes T localisés préférentiellement dans poumons, intestins, et qui pourraient présenter les mêmes caractéristiques que les cellules TRM. Nous allons déterminer si cette nouvelle population est capable de circuler par le sang d'un organe à un autre, ou si les cellules vivant dans un organe donné n'en sortent plus. D'un point de vue thérapeutique, il est important de déterminer si ces cellules sont capables ou non de circuler pour savoir si l'effet anti-infectieux/anti-cancéreux est uniquement localisé ou bien s'il peut profiter à tout l'organisme (lutte contre les métastases).

Cette question sera adressée grâce à l'utilisation du modèle parabiotique dans lequel deux souris sont jointes l'une à l'autre de façon à permettre la libre circulation sanguine entre les deux animaux. L'absence de cellules d'une souris dans les organes de l'autre indiquerait que les cellules étudiées ne recirculent pas par le sang.

Nombre d'animaux pour ce projet : 44

Types d'animaux : souris porteuses d'un marqueur permettant de déterminer la provenance des lymphocytes dans les tissus.

Remplacer : L'analyse *ex vivo* d'échantillons de tissus humain a montré que les lymphocytes que nous étudions sont abondants dans l'intestin, les poumons et le foie. Ils expriment certains marqueurs suggérant une résidence tissulaire. Compte tenu de leur abondance dans le sang, il est toutefois possible que ces cellules ne soient pas résidentes mais circulent d'un organe à l'autre par le sang. Ni les modélisations mathématiques, ni les systèmes *in vitro* ne permettent de déterminer le caractère résident ou recirculant des lymphocytes T.

Réduire : Le nombre d'animaux est calculé statistiquement pour utiliser un minimum d'animaux et une expérience pilote est mise en place.

Raffiner : le protocole chirurgical le moins invasif à ce jour a été choisi. Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et pour monitorer les éventuels signes de souffrance ou de stress. Les expérimentations seront arrêtées avant l'atteinte des points limites définis.

7133. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des mélanges glucidiques visant à l'amélioration de la régulation glycémique chez l'humain en les substituant au glucose présent dans certains aliments. L'étude permettra de réaliser une première preuve de concept de l'efficacité de ces mélanges chez le rat.

L'objectif de l'étude sera d'évaluer l'impact de 5 mélanges glucidiques (la composition des mélanges est gardée confidentielle pour des raisons contractuelles) sur :

- la variation de glycémie mesurée après administration orale des mélanges par un test de tolérance oral;
- la variation du taux d'oxydation des glucides mesurée après administration orale des mélanges par calorimétrie indirecte.

Les résultats obtenus seront comparés à ceux obtenus après une administration d'une solution de glucose 30%.

Les deux paramètres (variation de glycémie et taux d'oxydation des glucides) seront mesurés après une administration unique des mélanges glucidiques, successivement sur les mêmes animaux. Une période "de chasse" (période sans traitement) d'une semaine sera appliquée entre les deux paradigmes.

Un total de 60 rats Wistar sera utilisé, divisé en 6 groupes de 10 animaux :

- Un groupe traité avec une solution de glucose (groupe contrôle)
- 5 groupes traités avec une solution réalisée avec l'un des mélanges glucidiques à tester (mélanges A à E).

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

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de divers composés pharmaceutiques ou agroalimentaires sur la régulation glycémique. Il s'agit d'un modèle de rat "sain", qui correspond à la cible humaine visée (amélioration de la régulation glycémique chez le sujet sain). Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages individuelles et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de briquettes en bois. Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

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

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'efficacité réelle d'un composé sur la régulation glycémique.

1734. La maladie de Parkinson, causée par une protéine, l'alpha synucléine, est une maladie neurodégénérative caractérisée par des problèmes d'équilibre, de mouvements et des déficits de mémoire. Les troubles du mouvement sont causés par la perte de cellules nerveuses, les neurones, d'une partie spécifique du cerveau, le striatum. Plus spécifiquement, ce sont les neurones du striatum produisant la dopamine, une substance permettant la communication entre les neurones qui dégèrent.

Les troubles du mouvement à des phases précoces sont difficiles à détecter chez les rongeurs injectés avec de l'alpha synucléine au niveau du cerveau car la dégénérescence des neurones produisant la dopamine est très lente. Il est possible de détecter ces troubles du mouvement à des phases précoces, et permettant ainsi de tester l'efficacité des médicaments destinés à guérir cette maladie, en injectant une petite quantité d'amphétamine. En effet l'amphétamine induit un relargage de dopamine des neurones du striatum produisant une augmentation de la locomotion chez l'animal sain. Chez l'animal présentant des symptômes parkinsoniens, dès la perte de neurones générant de la dopamine, l'injection d'amphétamine à faible dose ne produit pas d'effet locomoteur.

Pour ce projet nous souhaitons faire la preuve de cette perte neuronale dans un modèle murin de la maladie de Parkinson, qui consiste à injecter de l'alpha synucléine dans le cerveau. Pour ce faire nous devons d'abord établir la dose minimale nécessaire pour induire une hyper-locomotion chez l'animal sain en utilisant trois doses. Puis quand cette dose est établie, injecter un groupe d'animaux sains (injectés dans le cerveau avec du sérum physiologique) et un groupe d'animaux "Parkinsoniens" injectés dans le cerveau avec de l'alpha synucléine. Cette dernière expérience se déroulera 30 jours après l'injection dans le cerveau, car c'est à ce moment-là que nous avons précédemment établie la présence d'alpha synucléine malade dans le striatum de ces souris, lors d'un projet précédent.

Nous utiliserons pour ces deux expériences 48 souris C57BL6J, couramment utilisés en recherche sur les maladies neurodégénératives, auxquels nous ajouterons 2 animaux afin de palier à la perte potentielle d'animaux lors de la chirurgie, soit un total de 50 animaux. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats exploitables statistiquement, tout en s'assurant de la non-utilisation d'animaux surnuméraires (réduction).

Les animaux sont hébergés en cage individuelle après l'injection intracérébrale pour éviter la réouverture de la plaie lors de jeux ou de bagarre dans la cage. Les cages contiennent de l'enrichissement environnemental (raffinement). Tout animal présentant des signes de stress ou de souffrance sera immédiatement mis à mort. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de cette étude.

7135. L'insuffisance rénale chronique terminale est le stade ultime de la plupart des pathologies rénales et se définit par une perte de la fonction rénale liée à des lésions anatomiques progressives et irréversibles. La transplantation rénale reste actuellement la meilleure option thérapeutique mais s'accompagne de la prise à vie d'immunosuppresseurs afin de prévenir le rejet de greffe. Parmi ceux-ci, le Tacrolimus est l'immunosuppresseur le plus prescrit mais son utilisation est limitée du fait de ses effets indésirables, et plus particulièrement de sa toxicité rénale chronique irréversible (Naesens et al, 2009). Dix ans après la greffe, il est admis que l'ensemble des transplantés développent des lésions de toxicité chronique avec des niveaux variables de sévérité (Nankivell et al, 2003).

La néphrotoxicité des anticalcineurines (Tacrolimus, Cyclosporine) se caractérise, à terme, par le développement de lésions fibreuses interstitielles rénales et une atrophie tubulaire. De plus, le processus de Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) contribuerait au processus de fibrogenèse.

*in vitro*, nous avons observé que l'exposition de cellules humaines épithéliales rénales proximales au Tacrolimus à différents temps entraîne la dérégulation de gènes impliqués dans le processus de fibrose et de TEM. Ainsi, afin de valider ces premiers résultats, il

est nécessaire de mettre en place un modèle murin d'exposition au Tacrolimus. En effet, le rein présente une grande hétérogénéité cellulaire et, à titre d'exemple, environ 15 types de cellules épithéliales ont été décrites. Nous utiliserons les souris de la lignée CD-1 en raison de leur sensibilité aux atteintes rénales. De plus, les souris bénéficieront d'une alimentation hyposodée afin d'exacerber les lésions rénales, par suractivation du système rénine-angiotensine-aldostérone. Ce choix permet ainsi de limiter le nombre d'animaux. En faisant l'hypothèse d'une fréquence de l'événement de 10% sans traitement et de 75% avec traitement, il est nécessaire d'inclure 7 souris par groupe (pour une puissance de 90% et un risque alpha de 5%). Les souris CD-1 étant « outbred », une variabilité de réponse pourrait être observée. C'est pourquoi, nous envisageons d'utiliser 8 souris par lot et par temps. 72 souris (8 souris par lot et par temps : un lot contrôle sous-alimentation normosodée, un lot sous-alimentation hyposodée et un lot tacrolimus sous-alimentation hyposodée sur trois temps) seront nécessaires à l'étude. Les animaux seront observés régulièrement afin de s'assurer de leur bien-être. Tout animal manifestant des signes d'inconfort sera sorti de l'étude.

Les résultats obtenus permettraient de mieux appréhender les phénomènes de toxicité rénale induite par le Tacrolimus. De plus, notre objectif est de développer des biomarqueurs précoces de néphrotoxicité des immunosuppresseurs. Les données obtenues permettraient du point de vue clinique de mieux guider le traitement anti-rejet des patients transplantés rénaux et de limiter le nombre de pertes de greffons rénaux lié à la toxicité rénale des traitements immunosuppresseurs. Au-delà du bénéfice médico-économique potentiel, cette démarche s'inscrit dans le cadre de la médecine personnalisée.

7136. La maladie d'Alzheimer peut avoir une origine génétique, cependant la forme la plus répandue ne l'est pas. Il n'y a pas de traitement efficace contre cette maladie. L'injection chronique de D-galactose à des rongeurs a démontré un effet dévastateur sur leur mémoire, ainsi que des changements biochimiques au niveau de leur cerveau, ressemblant à la pathologie humaine. Nous souhaiterions valider ce modèle, mais en administrant le composé dans l'eau de boisson (raffinement) afin de pouvoir ensuite tester des molécules visant à guérir cette maladie. Nous additionnerons l'eau de boisson de 24 souris avec du D-galactose et ajouterons un groupe témoin (eau normale) contenant 12 animaux soit un total de 36 animaux. Ce nombre est nécessaire et suffisant pour permettre l'interprétation des résultats (réduction). L'addition de D-galactose sera poursuivie pendant 9 semaines.

Ces animaux seront testés 3 fois (à 5, 7 et 8 semaines après le début du traitement avec le D-galactose) dans deux modèles de mémoire : la reconnaissance d'objets et le test de mémoire topographique. A partir de la semaine 8, les animaux seront soumis à un test d'apprentissage de la mémoire spatiale (Piscine de Morris), impliquant de trouver une plateforme submergée dans un piscine en se servant de repère placés dans le laboratoire. L'étude de la mémoire ne peut s'effectuer qu'avec des animaux.

Test de mémoire topographique : Ce test utilise une boîte expérimentale comprenant deux compartiments de forme et d'aspect modulables par addition d'inserts. Les deux compartiments sont connectés par un couloir. Le principe du test est le suivant : L'animal est placé pendant 5 minutes dans la boîte, mais seulement un compartiment est accessible (phase d'acquisition). L'animal est ensuite replacé dans sa cage. Après 30 minutes, l'animal est replacé dans la boîte (phase de restitution) alors que les deux compartiments sont accessibles. Si l'animal se rappelle du compartiment visité lors de la phase d'acquisition, il explorera le nouveau compartiment. Le temps passé par l'animal en exploration active dans chaque compartiment est mesuré afin d'établir une mesure de la mémoire topographique.

Pour le test de reconnaissance d'objets le principe est similaire au test précédent sauf que l'animal est d'abord mis en présence de deux objets identiques pendant la phase d'acquisition, puis un des objets est remplacé avec un nouvel objet, non vu auparavant, lors de la phase de rétention. Ces deux tests évaluent deux types de mémoire bien distincts et modulés par deux zones distinctes du cerveau.

Test de la piscine de Morris : Pendant 7 jours les animaux apprennent à localiser une plateforme submergée en utilisant des repères spatiaux, le jour suivant ces animaux sont testés.

L'administration de D-galactose dans l'eau de boisson n'induit que des déficits de mémoire, ces animaux ne sont pas dissociables d'animaux non traités.

Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal (perte de poids, stress, signes de souffrance, prostration) soit notée, l'animal sera euthanasié immédiatement.

Dans tous les cas, tous les animaux seront euthanasiés après le dernier test comportemental, le sang et le cerveau prélevés afin de déterminer les similitudes avec la pathologie humaine.

7137. Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Les cellules cancéreuses MSI accumulent des ARN messagères aberrant portant un codon stop prématuré dans leur séquence, ce qui induit la production de protéines tronquées mutantes.

La protéine chaperonne HSP110, surexprimée dans plusieurs cancers dont le cancer colique, est présente dans la cellule en deux isoformes, appelées alpha et beta. La forme beta est issue d'un épissage alternatif de l'exon 12. L'exclusion de cet exon induit le transport nucléaire de la protéine HSP110 beta à cause du démasquage de la séquence NLS (nuclear localisation séquence). Nos données cliniques montrent que l'expression nucléaire d'HSP110 est associée à un mauvais pronostic chez le patient atteint de cancer colique.

Notre objectif est de démontrer que la surexpression de la forme beta donc la forme nucléaire d'HSP110, induit une augmentation de la croissance tumorale ainsi qu'une résistance aux agents-anticancéreux (5-Fluorouracil et Oxaliplatine), prescrits en routine pour le traitement adjuvant des cancers du côlon.

Le protocole pour cet objectif consiste à xénotransplanter des cellules cancéreuses (lignées de cancer colique) qui surexpriment de manière stable la forme beta et/ou la forme alpha d'HSP110. A la suite de la prise de greffe les souris seront traitées ou pas avec un protocole de traitement au 5-FU et l'Oxaliplatine qui a déjà été validé dans notre laboratoire. Nous estimerons la progression tumorale à l'aide des mesures de la taille de la tumeur avec un pied à coulisse.

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 120 souris NMRI-NudeFoxn1(Nu/Nu) pour une durée maximale de 1 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, 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.

7138. Projet : Durant la gestation, un faible nombre de cellules fœtales passe dans la circulation maternelle tout au long de la grossesse chez tous les mammifères ; ces cellules sont bien tolérées par le système immunitaire et persistent pendant des décennies en se nichant dans la moelle osseuse de la mère. Des études ont montré la présence/recrutement spécifique de ces progéniteurs fœtaux dans les tissus lésés (foie, cerveau, cœur et peau). Ces derniers participent à la réparation cutanée, et pourraient avoir un avantage sélectif lorsque celle-ci est altérée (restauration du phénotype sauvage). Des travaux en cours de soumission réalisés par l'équipe ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation CCR2/CCL2 dans la mobilisation des cellules fœtales au sein des plaies maternelles. L'équipe veut à présent tester l'effet de ces cellules sur d'autres lésions maternelles que la peau tel que le foie. Le but de ce projet est donc d'évaluer -chez des souris post-gestantes- l'effet de CCL2 sur la réparation d'un foie fibrotique (donc à phénotype altéré) à travers le recrutement de cellules fœtales.

Type d'animaux : Dans le cadre de ce projet 2 modèles seront utilisés, un modèle CaG-eGFP permettant une expression ubiquitaire de la GFP (à l'exception des poils et des cellules anucléées) nous permettant de suivre le devenir des cellules fœtales et des souris C57BL/6J wild-type.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation de 240 souris expérimentales maximum pour une durée de 5 ans. Ce nombre est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

7139. Projet : Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur primitive du foie difficile à traiter qui constitue un enjeu de santé publique à l'échelle mondiale. De nombreux arguments suggèrent que l'hyperinsulinémie joue un rôle important dans le développement et la progression du CHC. La consommation excessive d'aliments riches en graisses est un facteur prédisposant à l'obésité, l'insulino-résistance et une hyperinsulinémie compensatoire. Ces dernières années, un lien de causalité entre obésité et augmentation du risque de développer un CHC a été établi.

Nous avons précédemment rapporté que l'expression de l'isoforme dite « fœtale » du récepteur de l'insuline (IR-A) est induite dans les tumeurs de CHC tandis que l'expression de l'isoforme dite « métabolique » (IR-B) est diminuée par un mécanisme impliquant une dérégulation de l'épissage alternatif sous contrôle de la voie de l'EGFR (epidermal growth factor receptor).

Dans la continuité de ce travail, nous avons récemment observé que le ratio d'expression IR-A/IR-B est significativement plus élevé dans les tumeurs humaines de CHC exprimant des marqueurs de mauvais pronostic telles que la taille, l'expression de marqueurs

de cellules souches et l'invasion microvasculaire. Un ratio tumoral IR-A/IR-B élevé est également associé à une moins bonne survie chez les patients opérés pour un CHC (résultats non publiés).

La surexpression de IR-A dans les cellules de CHC augmente très fortement leur potentiel tumorigénique *in vivo* chez la souris nudessousmise à un régime standard tandis que la surexpression de IR-B semble au contraire freiner la progression tumorale. La surexpression de IR-A semble également orienter les cellules vers une transition épithélio-mésenchymateuse (résultats non publiés). Nous souhaitons poursuivre nos investigations en examinant l'impact d'un régime riche en graisses sur la progression des tumeurs surexprimant l'une ou l'autre des isoformes du IR.

Type d'animaux : Nous souhaitons utiliser dans le cadre de ce projet un modèle de xéno greffe chez la souris immunodéprimée mise sous régime riche en graisse : souris Hsd:athymicNude-Foxnu et B6.Cg/NTac-Foxn1nu NE10

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 90 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal qui reste cependant indispensable. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicole (coton, maison, etc.).

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

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

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

7140. Le but de ce projet est d'étudier la cicatrisation cutanée chez des souris femelles gestantes. En effet, il a été montré que durant la gestation, un faible nombre de cellules fœtales passent dans la circulation maternelle tout au long de la grossesse, sont tolérées par le système immunitaire et persistent pendant plusieurs décennies (principalement dans la moelle osseuse). Des études antérieures ont montré la présence/recrutement spécifique de ces progéniteurs fœtaux dans les tissus lésés (foie, cerveau, cœur et peau). Ces dernières participent à la réparation cutanée, et pourraient avoir un avantage sélectif lorsque celle-ci est altérée (restauration du phénotype sauvage). Des travaux en cours de soumission réalisés par l'équipe ont mis en évidence l'implication de la voie de signalisation CCR2/CCL2 sur la mobilisation des cellules fœtales au sein des plaies maternelles.

Les défauts de cicatrisation constituent en pathologie humaine un problème de santé publique dans les pays occidentaux mais aussi dans ceux en voie de développement. De manière plus précise, 1 à 2% des personnes vivant dans le monde occidental développera un ulcère des membres inférieurs. Chaque année, aux Etats Unis, il y a 6,5 millions de personnes présentant des ulcères chroniques. En Europe, 5 à 15 % des personnes âgées entre 30 et 70 ans sont atteints d'une insuffisance veineuse des membres inférieurs, parmi lesquelles au moins 1% seront compliquées d'ulcère variqueux. Aux Etats Unis, le coût global lié aux soins et à la morbidité des plaies cutanées est estimé à 13 à 15 milliards de dollars par an et celui des traitements des ulcères veineux à lui seul s'élève à 3 milliards. Il apparaît donc important de développer de nouveaux traitements efficaces et facilement accessibles pour les problèmes de cicatrisation cutanée.

Type d'animaux : Nous utiliserons dans le cadre de ce projet 3 modèles murins transgéniques sur fond génétique C57BL/6J :

- un modèle CaG-eGFP permettant une expression de la GFP, pour suivre le devenir des cellules fœtales ;
- un modèle CCR2 KO afin d'observer l'effet de l'inactivation la voie de signalisation CCR2/CCL2 les cellules fœtales circulantes;
- un modèle CCR2 KO GFP afin de suivre le devenir de ces cellules en l'absence de la voie de signalisation CCR2/CCL2.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 58 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

7141. Projet : La biologie de la cellule cancéreuse présente une plasticité qui peut être modulée ou reprogrammée pour maintenir un état plus différencié et moins agressif afin de limiter sa croissance et sa capacité à métastaser. Le but principal de notre projet est fondé sur ce concept. Nous cherchons à identifier des facteurs pouvant induire la reprogrammation des cellules tumorales. Nous étudions, un complexe neuropeptide et son récepteur ainsi que des hormones et anti-hormones stéroïdiennes utilisées à des fins thérapeutiques.

Nous avons montré que lorsque le complexe, neurotensine/récepteur de haute affinité, NTS/NTSR1, est présent dans les cellules cancéreuses les effets cellulaires à caractère oncogénique (croissance, adhérence, invasion, migration) sont amplifiés. La forte expression du NTSR1 est un marqueur pronostique indépendant dans les tumeurs du sein et du poumon. Dans des tumeurs expérimentales de sein et de poumon, nous avons démontré la contribution du complexe NTS/NTSR1 dans la croissance des tumeurs et l'émergence de métastases.

Notre projet est de comprendre les mécanismes cellulaires, moléculaires et les signalisations mises en jeu. Pour cela, nous développons des approches précliniques utilisant les lignées cancéreuses afin de démontrer la contribution de ce complexe dans la croissance tumorale et dans le processus métastatique. Nous avons développé des anticorps monoclonaux ciblant le complexe NTS/NTSR1. Nous souhaitons tester leur efficacité sur la progression tumorale et la réponse aux agents antitumoraux utilisés dans les protocoles cliniques. Notre projet de recherches translationnelles, développe ces aspects précliniques sur des tumeurs expérimentales, à partir de lignées cellules cancéreuses présentant différents degrés de différenciation et d'agressivité. L'objectif à terme étant de déterminer des combinaisons thérapeutiques permettant de diminuer la progression tumorale chez l'homme.

Notre projet est de démontrer l'efficacité des anticorps anti-neurotensine pour diminuer la croissance tumorale et d'inhiber le processus métastatique. Notre but final est d'associer ces anticorps en tant que médicament aux traitements actuels. Les protocoles thérapeutiques sont non seulement différents selon les types de cancers et mêmes différents pour les sous types d'un même cancer. L'intérêt de multiplier les modèles cellulaires est de pouvoir tester l'efficacité de nos anticorps sur le traitement standard utilisé pour un cancer particulier. Par exemple le traitement standard du cancer bronchique est le cisplatine alors que pour le cancer de l'ovaire c'est le carboplatine ou le Taxol.

Le choix de ces lignées s'est porté sur des types de cancers pour lesquels nous pensons pouvoir apporter grâce à nos anticorps une amélioration de la réponse au traitement standard. Néanmoins afin de limiter les expériences sur les tumeurs expérimentales nous validons nos hypothèses par des expériences *in vitro*.

Type d'animaux : Nous souhaitons utiliser dans le cadre de ce projet un modèle de xénogreffe chez la souris immunodéprimée NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1024 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal qui reste cependant indispensable. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicole (coton, maison, etc.).

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de projet. Afin de limiter les expériences sur les tumeurs expérimentales nous validons nos hypothèses par des expériences *in vitro* au préalable. Cependant, il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. Nous utilisons des souris NMRI-Nude Foxn1 car elles n'ont pas de système immunitaire et donc peuvent être greffées avec des cellules d'origine humaine.

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

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

7142. Le présent projet s'intéresse aux réseaux neuronaux et aux mécanismes de la mémoire épisodique ou souvenir, c'est-à-dire la mémoire par laquelle on se souvient d'événements vécus avec leur contexte. Ces mécanismes sont encore largement méconnus et ce projet de recherche fondamentale a pour objectif de mieux les comprendre. La formation, le maintien dans le temps et le rappel de la mémoire font intervenir de nombreuses régions cérébrales. Certaines de ces régions sont spécialisées dans le traitement d'informations sensorielles, comme le bulbe olfactif pour les odeurs ou le cortex auditif pour les informations sonores alors que d'autres sont dites associatives ou intégratives puisqu'elles reçoivent des informations de multiples sources. C'est notamment le cas de l'hippocampe et du cortex préfrontal deux régions majeures impliquées dans la formation et le rappel de la mémoire. Pour qu'une

mémoire se forme et puisse être rappelée, il est nécessaire que ces multiples régions dialoguent entre elles. Ce dialogue repose sur l'existence de connexions anatomiques mais aussi fonctionnelles qu'il est possible d'étudier au moyen de l'électrophysiologie. Cette approche consiste à introduire des microélectrodes au sein des régions d'intérêt pour recueillir et analyser l'activité électrique de neurones individuels et de populations de neurones. En outre, la mémoire met en jeu des mécanismes de neurogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux neurones, et des mécanismes de plasticité cellulaire permettant aux neurones déjà présents d'adapter leurs connexions et leur fonctionnement aux nouvelles informations qui leur parviennent.

Notre projet propose de réaliser des enregistrements électrophysiologiques chez le rat, un animal de choix pour les études de la mémoire et dont la taille de cerveau est compatible avec l'insertion intracérébrale de plusieurs électrodes. Inenvisageable chez l'Homme cette approche expérimentale requiert l'utilisation d'animaux vivants en comportement, notamment pour établir des liens entre des activités électriques cérébrales multiples et un comportement. Il propose en outre de réaliser de l'imagerie cellulaire pour détecter les régions cérébrales activées lors de la formation et du rappel de la mémoire. Ces travaux seront réalisés chez l'animal au cours d'une tâche comportementale de mémoire épisodique, à la fois sur des rats normaux et sur des rats dépourvus de neurogénèse par suite d'une irradiation sélective. L'irradiation est réalisée dans un autre laboratoire dans des conditions comparables à celle des radiothérapies anti-cancéreuses mais avec des doses de radioactivité bien moindre pour éviter tout risque sur le bien-être général.

La tâche comportementale consiste à exposer les rats à deux épisodes de vie distincts au cours desquels ils vont associer des odeurs avec un endroit donné de la cage, une boisson (eau sucrée ou amère) et un contexte particulier. Après exposition à ces deux épisodes, un test de rappel à court terme (le jour suivant) ou à long terme (un mois après) est réalisé pour déterminer ce dont l'animal se souvient. Ce protocole fait appel à une restriction d'accès progressive à l'eau de boisson sans incidence sur le bien-être des rats. Les résultats comportementaux, électrophysiologiques et d'imagerie cellulaire de cette tâche de mémoire épisodique seront comparés à ceux d'une tâche de reconnaissance d'objet au cours de laquelle on teste la préférence spontanée des rats pour objets nouveaux.

Les résultats attendus sont une meilleure connaissance des mécanismes neuronaux de la mémoire, et plus largement sur le fonctionnement coordonné de régions cérébrales multiples.

Ce projet s'appuie sur l'utilisation d'un nombre total d'animaux estimé à 662 au cours des cinq prochaines années. Ce nombre est basé sur notre expérience en matière d'enregistrement électrophysiologique chez le rat en comportement. Il tient compte d'un effectif minimal pour obtenir des groupes d'animaux présentant des profils comportementaux comparables, un placement reproductible des électrodes au sein des régions cérébrales visées et de très rares pertes accidentelles liées à la chirurgie.

Pour la réalisation de ce projet, le bien-être animal est une condition essentielle à laquelle on veille tout au long de l'expérience. D'abord en veillant aux bonnes conditions d'hébergement et en réduisant le nombre d'animaux au strict nécessaire pour établir des conclusions statistiques viables et reproductibles. Ensuite en réalisant sous anesthésie générale l'ensemble des gestes susceptibles de créer de la douleur ou des dommages, comme l'implantation stéréotaxique de microélectrodes. Dès leur arrivée au laboratoire une surveillance quotidienne des animaux est mise en place de façon à détecter au plus tôt la survenue éventuelle de signes de douleur ou de détresse et ceci à toutes les étapes des expériences. Dans la mesure du possible, nous réaliserons des expériences complémentaires sur les mêmes animaux de façon à limiter le nombre total d'animaux utilisés.

7143. Les traitements antalgiques de la migraine chronique restent encore de nos jours insuffisants voire inefficaces pour réduire de façon significative les handicaps liés à cette pathologie. la migraine se caractérise par des crises à hautes fréquences de céphalées accompagnées d'une hypersensibilisation à de nombreux stimuli (olfactifs, visuels, auditifs, mécaniques). L'hypersensibilité mécanique ou allodynie (stimulus mécanique léger comme le toucher ressenti comme une douleur) constitue un marqueur de progression de la migraine vers le stade chronique.

Nous savons que les astrocytes (cellules nerveuses qui collaborent avec les neurones) sont significativement impliqués dans la modulation des messages nociceptifs notamment dans l'allodynie mécanique. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la migraine, il apparaît donc nécessaire de savoir si les astrocytes jouent un rôle majeur dans ses mécanismes physiopathologiques. Sachant qu'il n'existe objectivement aucune méthode alternative pour ce type d'étude, nous proposons d'étudier l'implication de l'activité des astrocytes dans un modèle animal (rat) de migraine où l'allodynie est déclenchée par injection intraveineuse répétée (1 injection / jour/ 5 jours) d'un vasodilatateur, l'isosorbide dinitrate (ISDN) connu chez l'homme pour déclencher des crises de migraine.

Au bout des 5 jours, par une approche électrophysiologique, nous pourrions enregistrer chez le rat anesthésié, les messages nociceptifs dans le noyau du trijumeau, premier relais central des messages nociceptifs céphaliques. En réponses à des stimulations périphériques. Nous pourrions étudier par cette approche les contrôles descendants inhibiteurs nociceptifs, CIDN (contrôles endogènes de la douleur) et savoir s'ils sont altérés par l'ISDN. Nous testerons ensuite les effets de l'injection d'une enzyme bloquant l'activité des astrocytes et vérifier l'implication de ceux-ci dans la modification des CIDN. Il s'agit d'une expérience sans réveil, avec une mise à mort en fin d'enregistrement par injection d'une dose létale de pentobarbital. Pour cette approche, 3 groupes de rats (n=10/groupe) seront nécessaires : 1 groupe témoin pour le test des effets de l'ISDN sur les CIDN, 1 groupe pour le test de l'enzyme + ISDN et 1 groupe pour le test injection de sérum physiologique + injection ISDN. Le nom de rat / groupe est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les traitements et calculé par tests statistiques adaptés. Chaque animal est enregistré en conditions témoins avant injection des agents astrocytaire et/ou ISDN ce qui contribue au respect des "R" réduire. Par une approche immunohistochemique, nous pourrions vérifier sur tissu (coupe d'encéphale), les variations d'expression de marqueurs d'activation neuronale et astrocytaire induites par l'ISDN répété. Pour ce faire, au bout de 5 jours d'ISDN (ou de liquide céphalo-rachidien LCR témoin), les rats seront anesthésiés et soumis (ou non) à des stimulations mécaniques de la face (brossage avec pinceau). Après ces stimulations, les animaux seront euthanasiés (ils ne seront pas réveillés) et les cerveaux seront prélevés afin de réaliser les coupes histologiques et les marquages par anticorps des protéines témoins d'activation. Pour cette approche, nous



utiliserons 4 groupes (n=8/groupe) de rats : 1 groupe constitué par des animaux ayant reçu du LCR sans stimulation mécanique, 1 groupe avec LCR + stimulation, 1 groupe ayant reçu l'ISDN sans stimulation et 1 groupe avec ISFN + stimulation.

Concernant nos méthodes visant à respecter le "R" de Raffiner, il est à noter que nos animaux sont sous anesthésie générale lors des enregistrements électrophysiologiques ainsi que lors des stimulations mécaniques de l'approche immunohistochimique. Concernant les périodes des 5 jours pendant lesquelles les animaux reçoivent les injections répétées (1/jour) d'ISDN, les animaux sont hébergés dans des cages standards bénéficiant d'un enrichissement social et environnemental adapté avec visites quotidiennes. De plus les animaux sont manipulés lors des séances de vérification de l'installation de l'allodynie qui est mesurée par l'application de fins filaments plastiques, calibrés en force, sur la face pendant 3 sec. La mesure consiste à déterminer quel est le filament le plus faible en force capable de déclencher un réflexe de retrait (nociceptif) de la face. Ainsi les animaux sont soumis à de très faibles stimulations nociceptives tant en durée qu'en intensité. Au final, le nombre total d'animaux pour ce projet est de 62 rats adultes mâles.

7144. L'information génétique, ou ADN, des cellules de l'organisme est fragilisée lors du vieillissement ou d'infections du cerveau. En particulier, il apparaît des cassures affectant les deux brins de la double hélice de l'ADN, qui peuvent entraîner des défauts de lecture de l'information génétique ou des mutations. Dans des cellules qui se divisent, ces altérations sont souvent à l'origine de cancers. Dans les cellules qui ne se divisent pas, comme les neurones, ces altérations seraient étroitement associées à des dysfonctionnements neuronaux et à des troubles cognitifs. Elles pourraient notamment contribuer aux désordres neuronaux associés aux infections du cerveau ou aux maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaques.

Cependant les conséquences exactes des cassures double-brin de l'ADN sur les processus cognitifs restent mal comprises. Une meilleure compréhension du rôle et les mécanismes de ces cassures dans les neurones revêt donc une importance capitale en recherche fondamentale et médicale. En effet, contrecarrer les dommages de l'ADN dans les neurones pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante.

Il n'existe, à ce jour, aucune solution pour protéger directement l'ADN des neurones. Néanmoins la détection des cassures double-brins est la première étape d'une réaction en chaîne conduisant à la mise en place des processus pathologiques suppresseurs d'information génétique. Ici, il est proposé de développer un modèle de souris dans laquelle la détection des cassures double-brin de l'ADN est déficiente uniquement dans les neurones, afin de déterminer son importance dans les processus pathologiques liés aux infections du système nerveux central ou à la réponse inflammatoire associée.

Le recours à un modèle animal est donc irremplaçable pour cette étude, puisqu'elle vise à déterminer les effets de la suppression de la détection des cassures double-brin de l'ADN sur le comportement et la cognition.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 944 souris sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée pour ce projet comme suit :

1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude intervient après de nombreuses études *in vitro* utilisant des modèles cellulaires qui ont démontré l'impact de facteurs produits par des pathogènes et de l'inflammation sur l'activation des cascades conduisant aux cassures double-brins de l'ADN. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car ces études *in vitro* ne permettent pas d'étudier l'importance des manipulations proposées sur le comportement et la cognition. Par conséquent les études *in vitro* 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, tout en permettant une analyse statistique valide des résultats. Des études sur des modèles animaux similaires ont montré que des groupes de 12 animaux par expérience comportementale étaient nécessaires. En outre, un même groupe d'animaux pourra être utilisé pour plusieurs tests comportementaux.

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 en accord avec le comité local de suivi du bien-être animal pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

7145. Ce projet porte sur l'optimisation des protocoles de notre équipe par l'utilisation de techniques d'imagerie récentes et performantes. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), permettra une étude fine des organes *in vivo* particulièrement utile dans le cadre de nos recherches sur les myopathies et en cancérologie. Ce protocole est par définition non-invasif c'est-à-dire qu'aucun geste n'est pratiqué sur les animaux. Afin d'assurer une qualité optimale des images obtenues et de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront anesthésiés durant la séance d'imagerie. Ce projet se place parfaitement dans le contexte des 3R puisqu'il permettra à terme par l'acquisition de ces techniques de réduire le nombre d'animaux impliqués dans nos études, d'optimiser nos protocoles par l'acquisition de techniques non invasives et d'accroître la pertinence des résultats obtenus. Au cours de cette étude 30 souris seront utilisées : 20 souris SWISS ou BALB/c, et 10 souris C57BL/6 (modèle de la Mucoviscidose).

7146. Afin d'étudier le métabolisme du glucose et des lipides et les physiopathologies associées telles que le diabète et l'obésité, nous utilisons des modèles de souris dont certains gènes sont délétés ou réintroduits. Afin de comprendre la physiopathologie du diabète et de l'obésité, le modèle souris est le mieux adapté car il permet une analyse intégrée de maladies à phénotype complexe et multi-tissulaire. Ce projet est la suite du projet ceaa482012. Dans ce projet le nombre d'animaux utilisés est de 3360 souris sur 5 ans. En physiologie, la règle des 3R est complexe à mettre en œuvre. Cependant, nous essayons de réduire le nombre d'animaux en gérant de manière optimale les croisements pour obtenir le nombre d'animaux escomptés, raffiner en adaptant plusieurs protocoles non

invasifs aux mêmes lots de souris, et remplacer en travaillant sur des lignées cellulaires lorsque l'expérimentation animale n'est pas nécessaire.

7147. Ce projet a comme but principal d'étudier les mécanismes neurobiologiques impliqués dans le risque persistant de rechute. L'addiction est un trouble mental caractérisé par la prise compulsive de drogue qui persiste malgré des conséquences négatives. L'un des problèmes majeurs dans le traitement de l'addiction est la prévention des rechutes qui peuvent être observées après une longue période d'abstinence. Par conséquent, pour mettre en place des stratégies thérapeutiques adéquates, il est fondamental d'identifier les circuits neuronaux spécifiquement impliqués dans la rechute, ainsi que la nature des éventuels dérèglements de ces réseaux. Notre principale hypothèse de travail est que la voie neuronale entre deux régions impliquées dans les émotions (l'amygdale) et dans l'interception (le cortex insulaire) joue un rôle majeur dans le risque de rechute. Nous utiliserons un modèle animal de l'addiction (auto-administration de cocaïne) et nous allons le coupler à des approches pharmacologiques et électrophysiologiques pour étudier des régions cérébrales qui participent au processus de rechute chez le rat. Ces techniques seront couplées à une approche pharmacogénétique utilisant l'injection d'un virus non pathogène, pour exprimer un récepteur modifié à la membrane des neurones cibles, qui sera ensuite spécifiquement et seulement activé par un composé synthétique. Ce projet est constitué de 4 procédures. La procédure 1 correspond à une chirurgie qui permettra l'implantation d'un cathéter dans la veine jugulaire des rats. La procédure 2 correspond à l'exposition des animaux à des cages opérantes. La procédure 3 correspond à des enregistrements électrophysiologiques *in vivo* chez le rat anesthésié. La procédure 4 correspond à des chirurgies stéréotaxiques.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'un processus psychologique, peut être uniquement menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles ainsi que des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA ainsi que par un calcul de puissance (réduire). Les animaux subissant une chirurgie seront traités pour de possibles douleurs post-opératoires (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 437 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui seront analysables statistiquement.

Cette recherche innovante fournira des informations critiques pour la compréhension des mécanismes sous-jacents aux risques persistants de rechute et pourra avoir un impact sur la prise en charge des maladies psychiatriques chez l'Homme.

7148. La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. De plus l'implantation a lieu dans les veines du foie ce qui génère une réaction inflammatoire intense qui va détruire jusqu'à 40% de la greffe. Ainsi dans le but de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, notre étude a pour but de tester un nouveau mode de transplantation qui permettra de tester des sites alternatifs à la transplantation dans le foie. Pour se faire, les îlots seront cultivés sur différents types de support qui seront cotransplantés. Une étude préalable de biocompatibilité des supports va donc être nécessaire afin de déterminer le choix d'une matrice de choix. Cette étude de biocompatibilité des supports matriciels sera réalisée au niveau des différents sites receveurs (muscle, peau, omentum). Cette étude a pour but de déterminer le site receveur se prêtant le plus à ce type d'implantation et le moins sensible aux éventuelles réactions inflammatoires provoquées par le biomatériau. La règle des 3R, soit réduire, raffiner, remplacer est respecté. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaires pour obtenir des résultats statistiques et ne pas avoir à recommencer l'étude. Les animaux seront hébergés à 5 par cage avec eau et nourriture ad libitum. Pour réduire le stress, les cages seront enrichies à l'aide de cylindres rouges en PVC. Les rats seront placés en cycle jour/nuit 12h/12h en condition de température et d'hygrométrie réglementaire. Afin de prévenir toute douleur et souffrance qui pourraient survenir les jours suivants la chirurgie, des injections d'antibiotiques, d'anti-inflammatoire et d'anti-douleur sont répétées jusqu'à cicatrisation de l'animal. De plus, même après cicatrisation et durant toute la durée de l'étude, les rats seront examinés quotidiennement afin de détecter d'éventuels symptômes de douleur. Le remplacement n'est pas possible dans cette étude, elle nécessite l'emploi des animaux pour réaliser un test de biocompatibilité. Un nombre de 396 rats sera nécessaire pour l'ensemble de l'étude.

7149. La fièvre de Lassa est une fièvre hémorragique virale aiguë d'une durée d'une à quatre semaines qui sévit en Afrique occidentale. Le virus de Lassa se transmet à l'homme par contact avec des aliments ou des articles ménagers contaminés par l'urine ou les excréments de rongeurs. La transmission interhumaine et en laboratoire se produit également, en particulier dans les hôpitaux où les mesures de prévention et de lutte anti-infectieuse sont insuffisantes. La fièvre de Lassa est endémique au Bénin, au Ghana, en Guinée, au Libéria, au Mali, en Sierra Leone et au Nigéria, mais elle est sans doute présente aussi dans d'autres pays d'Afrique occidentale. Le taux global de létalité est de 1%. Celui des patients atteints de formes sévères peut atteindre 15% en milieu hospitalier. Des soins de soutien précoces, axés sur la réhydratation et le traitement symptomatique, améliorent les chances de survie. Actuellement, aucun vaccin ne protège contre la fièvre de Lassa.

L'objectif de ce projet est de développer des vaccins contre la fièvre de Lassa et de tester les candidats chez le primate non humain, une étape essentielle vers un essai clinique de phase I.

Sur la base des connaissances actuelles de la pathogénèse du virus de Lassa (LASV) et des qualités qu'un vaccin efficace doit posséder (innocuité, stabilité, immunogénicité), des candidats vaccins différents ont été développés. Il a été démontré

expérimentalement que ces vecteurs peuvent induire une immunité protectrice contre LASV et plus largement contre d'autres arénavirus pathogènes.

Le recours à l'animal et notamment aux primates non-humain ne peut être substitué car il n'existe pas de modèles *in vitro* ou rongeurs capables de reproduire la physiopathogénèse et les réponses immunitaires retrouvées chez l'Homme au cours de la fièvre de Lassa. Dans ce projet, 21 macaques *Cynomolgus* seront répartis en 6 groupes pour tester les différents types de vaccins en dose unique. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, 3 est le nombre minimum nécessaire pour être représentatif statistiquement. En revanche, le groupe témoin utilisé pour prouver l'infection par le virus n'est plus nécessaire avec les nouvelles méthodes de mesure de l'efficacité d'un virus, réduisant ainsi le nombre d'animaux. Les animaux seront hébergés en groupe social et bénéficieront d'un programme d'enrichissement adapté.

7150. L'objectif de ce travail est de réparer / régénérer un tissu osseux après lésion en utilisant des cellules souches pulpaire [DPSC] murines extraites de la partie vivante d'une dent (la pulpe dentaire), ensemencées dans un matériau biologique (matrices de collagène) et enfin implantées en remplacement d'une partie de l'os pariétal de la boîte crânienne chez la souris. L'étude est réalisée dans un modèle d'ingénierie tissulaire de la sphère cranio-faciale.

Après anesthésie par mélange kétamine/xylazine, les craniotomies standardisées sont réalisées à l'aide d'un trépan. Les défauts osseux ainsi réalisés sont ensuite comblés par différentes matrices cellularisées. Ce modèle est celui du défaut osseux dit critique car ne pouvant se réparer / consolider spontanément seul. Les animaux reçoivent une médication postopératoire à base d'ibuprofène. Après 8 semaines, les pièces crâniennes sont prélevées pour examen radiographique par scanner à rayons X et analyse histologique. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, 60 souris seront nécessaires en fonction des effets observés, ce qui permettra d'envisager une étude adéquate sur le plan statistique. Pour éviter toute douleur chez la souris, la chirurgie et toutes les séances d'imagerie seront réalisées sous anesthésie générale. Un suivi attentif des signes d'infection et de douleurs avec des antalgiques et des antibiotiques prévus si nécessaire.

Si des matrices de collagène ont déjà été utilisées pour l'ingénierie tissulaire, l'intérêt de matrices 1/ denses, 2/ cellularisées avec des cellules souches pulpaire, et 3/ dans des modèles d'ingénierie tissulaire de la sphère cranio-faciale, n'a à ce jour peu ou pas été investigué chez l'animal. D'autre part, des études menées chez l'animal sur la régénération musculaire ont montré que ce type de matrice de collagène est particulièrement bien toléré et n'est pas susceptible d'entraîner de réaction inflammatoire chez les souris.

La régénération osseuse présente une biologie complexe que l'on ne sait pas reproduire par ingénierie actuellement : participation et interaction de différents types cellulaires, apport de la vascularisation. Ces processus complexes ne peuvent être mimés en utilisant des cultures *in vitro* ou des modèles informatiques. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

7151. Le cerveau est constitué de neurones ainsi que d'un autre type cellulaire au moins aussi abondant appelé astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, l'implication des astrocytes et de leurs interactions avec les neurones dans le contrôle des fonctions cérébrales dans un contexte normal ou pathologique reste très peu connu. Tel est précisément le but de ce projet.

Pour accéder à l'activité des astrocytes et des neurones, nous travaillerons chez la souris. Ce projet vise à étudier le rôle d'une protéine astrocytaire dans l'addiction. En effet, les astrocytes ayant un rôle prépondérant dans la régulation des niveaux de neurotransmetteurs dans l'espace de communication entre deux neurones (synapse), nous nous proposons d'étudier le rôle de cette protéine astrocytaire en réponse à un traitement chronique aux psychostimulants de type cocaïne dont la consommation a quasiment triplé au cours de ces 15 dernières années (cocaïne, MDMA/ecstasy et amphétamines : évolution de 3,8% depuis 2000). Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées, déficientes pour cette protéine. Nous comparerons leur comportement locomoteur après une prise de cocaïne à celui de souris non génétiquement modifiées.

Sur ces 12 mois de projet nous utiliserons un total de 80 souris. Nous analyserons notamment les activités locomotrices des animaux après injections chroniques de cocaïne. Cette chronicité implique un suivi et donc une "réutilisation" des animaux. Ceci permettra de réduire leur effectif tout en minimisant la variabilité entre les animaux.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante : (1) Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les injections de cocaïne afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3) Ce projet de neurosciences implique une analyse comportementale déjà bien caractérisée chez la souris. Le suivi longitudinal des animaux opérés permettra de réduire le nombre de souris utilisées.

7052. La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente dans le monde et elle est en nette augmentation, notamment à cause du vieillissement croissant de la population. Elle débute par des troubles de la mémoire et conduit à un état grabataire et à la mort après une durée moyenne de 7 à 10 ans. Cette maladie est donc devenue un véritable enjeu de santé publique. A ce jour, aucun traitement efficace contre la MA n'existe. La recherche de nouvelles molécules est donc indispensable. La MA est une pathologie plurifactorielle, conduisant à de nombreuses lésions cérébrales.

Ce projet de recherche vise à étudier les effets protecteurs de polyphénols (la viniférine et ses dérivés) dans un modèle expérimental murin de la MA.

Ce projet se déroulera sur 4 ans avec 4 procédures expérimentales et nécessitera un total de 540 souris pour la validation complète des résultats dont 240 souris transgéniques Alzheimer et 300 souris contrôles non Alzheimer. Ce projet a été construit en tenant compte de la règle des 3R. Le nombre de souris a été calculé pour réduire au maximum le nombre d'animaux dans cette étude tout en restant dans une limite acceptable pour les analyses statistiques (plusieurs analyses sur les mêmes animaux). Toutes les procédures décrites dans ce projet respecteront le raffinement en vue de réduire toute douleur (utilisation d'antalgiques, anesthésiques pour les prélèvements en fin de procédure) et les expérimentateurs devront être vigilants sur l'application des paramètres recommandés pour l'hébergement des animaux et respecteront la visite quotidienne. Aucune alternative de remplacement n'est possible dans cette étude. L'étude sur l'animal devient incontournable à ce stade de notre thématique de travail translationnel. Cette première étude préclinique permettra d'évaluer l'intérêt de la viniférine ou ses dérivés dans le traitement de la MA.

7153. *Dermanyssus gallinae* (Acari: Mesostigmata), le pou rouge des poules, est un acarien hématophage inféodé aux oiseaux, dont la prévalence est élevée en élevage de poules. Responsable de dégâts directs (stress entraînant une baisse de rendement, déclin des œufs tachés par les acariens) et indirects (transmission de salmonelles, allergies chez le personnel), il doit être combattu, mais s'avère largement récalcitrant aux moyens de lutte conventionnels. En effet, comme il ne vit pas sur l'hôte, mais passe l'essentiel de sa vie caché dans des interstices divers (perchoirs, pondoires...) et en particulier sous les fientes de poule séchées, son contrôle par l'application de produits pulvérisés est généralement peu efficace. Non seulement traiter directement les animaux n'est pas approprié, mais encore les traitements préconisés, par pulvérisation dans le bâtiment, ne touchent qu'une infime partie de la population et sont souvent d'une efficacité limitée.

Face à l'expansion actuelle de l'acarien et dans un objectif de réduction des intrants de synthèse, le développement de moyens de lutte alternatifs est un enjeu majeur. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet : il vise à développer la lutte contre l'acarien par manipulation des émissions chimiques provenant de la poule et/ou de ses fientes. Partant du principe que rendre la poule inappétante pour l'acarien et/ou les habitats fournis au pou par les fientes sèches inhospitalières contribuerait fortement à limiter les populations du parasite, nous collaborons avec une société qui développe des additifs alimentaires à base de composés d'origine végétale. Pour ce faire, nous cherchons à identifier des molécules volatiles émises directement par le corps de la poule et/ou par ses fientes après ingestion d'un additif alimentaire actuellement disponible et à rechercher parmi elles celles qui sont répulsives vis-à-vis du pou rouge. Afin d'évaluer avec robustesse les changements induits par cette ingestion, en prenant en compte la variabilité interindividuelle probablement élevée, nous envisageons d'impliquer au total 20 poules dans les expérimentations.

En ce qui concerne la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner), nous ne pouvons pas remplacer l'animal cible (la poule), car nous nous trouvons face à des processus biologiques et biochimiques dont nous ne maîtrisons pas le détail et que nous ne pouvons donc pas mimer. Le nombre de poules à tester est réduit à 20, car c'est le minimum pour obtenir des données d'écologie chimique statistiquement robustes (nécessité d'évaluer les variations interindividuelles et intra-individuelles des odeurs émises pour les prendre en compte dans l'évaluation des changements induits par l'additif alimentaire). Nous raffinons les expérimentations en offrant aux poules la possibilité d'exprimer leur comportement naturel (grattage, picorage, ponte). En outre, aucune manipulation douloureuse n'est pratiquée durant le projet.

7154. La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative progressive, affectant le cerveau et est caractérisée par l'apparition de troubles moteurs et cognitifs.

Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme le striatum et la substance noire, impliquées dans les mouvements, la coordination et les troubles de la mémoire.

La neurotoxicité du peptide alpha synucléine est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les différents déficits de la maladie.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires) en utilisant une plateforme d'analyse préclinique *in vivo* (souris) visant à évaluer la force musculaire, la coordination motrice, les troubles cognitifs en utilisant le test de la reconnaissance d'objet et l'anxiété en utilisant le test de la boîte clair-obscur. Ces tests ne sont pas ou très peu aversifs et de très courte durée.

Afin d'optimiser l'efficacité des criblages de molécules, de réduire les risques d'échec des expérimentations chez l'animal et de diminuer le nombre d'animaux impliqués dans les études précliniques (réduction), les candidats médicaments potentiels auront été évalués préalablement sur des cultures de cellules nerveuses. - Seuls les composés ayant montré une efficacité neuroprotectrice *in vitro* sont alors testés *in vivo* (ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux impliqués dans les tests *in vivo*, si le test *in vitro* précédent n'était pas effectué). Cependant avant d'effectuer une étude d'efficacité, nous nous assurerons que les doses du candidat médicament n'induisent pas d'effets indésirables, rendant alors impossible l'étude d'efficacité, en testant la plus forte dose du candidat médicament sur trois animaux afin d'évaluer les effets indésirables potentiels. Si un des animaux montre un effet indésirable, alors l'étude d'efficacité ne sera pas effectuée.

L'étude des effets de composés sur la motricité et la mémoire n'est possible que sur l'animal vivant et le remplacement par d'autres méthodes n'est pas possible.

Les phases précoces de la maladie de Parkinson sont modélisées chez la souris (C57Bl/6J, lignée de souris classiquement utilisée en neurobiologie) grâce à une injection intracérébrale, effectuée dans des conditions aseptiques et sous anesthésie générale, unique de peptide alpha-synucléine. Les animaux sont traités par des anti-inflammatoires ayant aussi des propriétés analgésiques avant et après la chirurgie stéréotaxique (raffinement) afin de minimiser la douleur (raffinement). Ainsi, après leur réveil, suivant la chirurgie, les

animaux ne sont pas dissociables d'une souris normale, n'ayant pas subi de chirurgie (raffinement), ce qui est nécessaire pour tester leur mémoire et leur activité motrice, car un animal souffrant ou stressé ne pourrait effectuer ces tests. Les animaux exposés à ce peptide développent des troubles moteurs légers de coordination motrice, non visible à l'œil nu) et de la mémoire, associés à des déficits synaptiques, caractéristiques des phases précoces de la maladie de Parkinson.

L'étude des phénomènes de ces déficits nécessite l'utilisation d'animaux non-stressés et en bonne santé. Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal, où qu'une inflammation due à la l'injection intracérébrale, ou au composé soit notée, l'animal sera euthanasié immédiatement. Dans tous les cas, tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude selon une méthode réglementaire. Notre modèle nous permet d'obtenir des réponses rapides et très reproductibles quant aux effets neuro-protecteurs de candidats médicaments pour le traitement et/ou la prévention de la maladie de Parkinson. Ce projet de cinq ans nécessite 2520 souris pour le test de 40 composés, chacun à trois doses. A ceci se rajouteront 3 animaux par composé testé pour le test préalable relatif aux effets indésirables, soit un total de 2640 souris

Les avantages des modèles développés (par rapport aux modèles de souris transgéniques classiquement utilisés pour ce genre de développement) sont divers : optimisation du nombre de composés à tester chez l'animal (réduction du nombre de composés potentiellement inactifs et donc d'animaux), optimisation du nombre d'animaux par groupe expérimentaux (réduction) tout en permettant d'obtenir un effet statistique.

Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de cette pathologie neurodégénérative impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapie(s) pour la maladie de Parkinson est un des enjeux majeurs de notre société.

7155. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Environ 80% des AVC sont dits ischémiques, c'est-à-dire induits par une interruption de la perfusion sanguine cérébrale. La majorité des AVC ischémiques est liée à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot (thrombus) transporté par la circulation sanguine jusqu'aux artères cérébrales (embolie cérébrale). La reperfusion du tissu cérébral peut être réalisée pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Alteplase) est le seul médicament thrombolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aigüe de l'AVC ischémique thrombo-embolique. Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique. De plus, son efficacité est limitée : chez environ 50 % des patients, l'administration du traitement ne permet pas la recanalisation des artères embolisées.

Des études précédentes ont montré qu'un nouveau traitement renforce les effets du rt-PA dans un modèle de thrombo-embolie cérébrale résistant au rt-PA seul chez le rat. L'objectif du présent projet est d'étudier l'évolution de la concentration du traitement circulant dans le sang au cours du temps jusqu'à 24h et de déterminer la modification de l'activité de l'enzyme cible de ce traitement. Cette étude est essentielle pour préparer les études cliniques à venir.

Ce travail se situe dans le cadre plus général de la recherche de nouvelles thérapeutiques dans le traitement pharmacologique de l'AVC thrombo-embolique. Le principal risque sur le plan éthique est que le développement des produits évalués n'aboutisse pas. L'évaluation des propriétés thrombolytiques d'une molécule *in silico* ou *in vitro* ne permet pas de prédire le comportement du traitement au cours du temps dans le système sanguin. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeu au cours de l'ischémie-reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisables par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez le rat (remplacement).

Au total, 70 rats mâles Wistar seront utilisés pour ce projet. Sur la base de notre expérience du modèle, le nombre de rat utilisé pour cette étude sera réduit au minimum (réduction) garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats.

Chaque rat sera soumis à 6 procédures : tout d'abord à un prélèvement de sang de 0,4 ml à une des veines de la queue pour préparer des caillots ou thrombi (P1), à l'induction d'une anesthésie par voie gazeuse (P2) pour la mise en place d'une pompe programmable et d'un cathéter placé au niveau de la veine jugulaire pour délivrer les traitements longs sur 6 heures ainsi que la mise en place d'un cathéter au niveau de l'artère fémorale pour recueils répétés de sang (P3), l'induction de l'AVC par injection de thrombi de taille calibrée au niveau de l'artère carotide en direction du cerveau (P4), et la mise en place de 2 accès au niveau des 2 veines de la queue pour les traitements initiaux courts (P5). Ces traitements initiaux courts seront effectués sur animaux vigiles par injection d'une partie initiale du traitement (bolus) puis du restant du traitement par perfusion pendant 1 heure. Les traitements longs prendront 6 heures. Sept prélèvements de sang à l'artère fémorale seront effectués au cours des 24 heures suivant l'injection des thrombi (P6).

Les animaux seront observés toutes les 15 minutes pendant les 12 premières heures suivant l'induction de l'AVC. Tout animal présentant une crise de convulsion supérieure à 5 minutes ou une incapacité à se déplacer avec une perte complète des réflexes posturaux sera euthanasié en conformité avec les recommandations éthiques.

Les animaux sont placés à 2 ou 3 par cage à leur arrivée puis en cage individuelle à partir de l'induction de l'AVC jusqu'à leur euthanasie afin de faciliter leur récupération de la chirurgie, de leur administrer les traitements, d'éviter l'arrachement de l'extrémité du cathéter placé au niveau de l'artère fémorale et sortant au niveau de la partie externe de la cuisse pour la réalisation des prélèvements sanguins, et de les surveiller (raffinement).

7156. Dans un contexte de changement climatique et de tension sur les ressources naturelles, un défi en production animale est de fournir de la nourriture à une population humaine en augmentation, en respectant l'équilibre entre qualité des produits, sécurité du consommateur et bien-être animal. Dans la perspective de promouvoir des systèmes alimentaires sains et durables, réduire l'usage des antibiotiques en élevage est identifié comme un enjeu majeur dans les années à venir, afin de réduire les risques

d'antibiorésistance. En effet, le transfert de gènes dans l'environnement et la chaîne alimentaire peut favoriser le développement de bactéries résistantes aux traitements antibiotiques, susceptibles de causer des problèmes majeurs en santé publique humaine comme en élevage.

En élevage porcin, la période du sevrage est souvent accompagnée d'une perte de croissance due à une alimentation irrégulière, et de diarrhées, qui pourraient être associées à un déséquilibre de la flore intestinale (microbiote) et/ou à des infections intestinales opportunistes. Pendant cette période, afin de réduire les risques de morbidité et de mortalité, l'usage des antibiotiques est fréquent. De fait, réduire l'usage prophylactique des antibiotiques lors du sevrage est une question de tout premier ordre et l'identification d'alternatives une nécessité.

Nous avons construit un partenariat public-privé qui rassemble des acteurs de la recherche publique et des industriels de l'alimentation animale et de la sélection porcine. Notre projet cible l'étude des bases physiologiques et génétiques de la sensibilité des porcelets au sevrage, prérequis indispensable à l'identification de leviers pour adapter les animaux et les systèmes de production à une réduction de l'usage des antibiotiques.

Un groupe de 400 porcelets est inclus dans le projet, nombre minimal pour une première estimation des paramètres génétiques de la sensibilité individuelle au sevrage. Le projet cible l'analyse de la fenêtre d'âge entre la naissance et 70 jours, avec des prélèvements de sang et de fèces avant et après sevrage. Les animaux seront ensuite suivis jusqu'à l'abattage pour des caractères de production.

Les animaux seront soumis trois fois à des prélèvements : deux fois pour du sang et des fèces, simultanément (28 et 35 jours après naissance) et une fois pour des fèces uniquement (60 jours d'âge). Tous ces prélèvements sont estimés comme de sévérité « légère ». Nous sommes attentifs à respecter les composantes réduction et raffinement de la règle des 3R. Le projet utilise un nombre minimum d'animaux pour des analyses génétiques, nombre validé par les résultats obtenus avec d'autres projets. Les interventions sont programmées avec parcimonie, et les protocoles en place et bien maîtrisés ont été élaborés pour limiter le stress des animaux. Ces expériences ne peuvent être conduites que sur animaux.

7157. La cachexie est une fonte de tissu musculaire associée à des maladies chroniques, tel que le cancer, responsable de la mort de 20% de patients de cancer. Nous nous intéressons au rôle du Serum Response Factor (SRF) en tant que médiateur de la mécanotransduction dans l'homéostasie du muscle squelettique cachectique. Notre objectif est d'évaluer le rôle de Srf dans la restauration de la masse musculaire des muscles cachectiques en présence de l'exercice physique. Nous souhaitons déterminer d'une part les signaux mécaniques régulant l'activité de SRF et d'autre part la contribution des cellules satellites à l'homéostasie du tissu musculaire cachectique. Ces études ont pour but d'identifier des nouvelles voies d'interventions pour une condition pathologie au présent incurable. Car nous avons précédemment démontré que les effets d'une tumeur *in vivo* ne sont pas entièrement reproduits par des traitements *in vitro* (par exemple, par des traitements des cellules musculaires avec des cytokines), la plupart des analyses souhaitées ne peuvent pas être reproduites *in vitro* ni *ex vivo*, ce qui impose l'utilisation des modèles murins adultes. Pour cela, nous utiliserons un modèle de souris transgéniques générés par nos collaborateurs porteurs de la tumeur C26, ColonCarcinoma chez lequel il est possible d'invalider le gène *srf* de manière conditionnelle et inductible dans deux compartiments cellulaires du muscle squelettique : les fibres musculaires et les cellules souches musculaires adultes (les cellules satellites). Pour estimer le nombre de souris nécessaires afin d'atteindre une significativité statistique, nous allons procéder à un calcul itératif pour estimer le *n* pour 1- $\beta$  (puissance) et 1- $\alpha$  (niveau de confiance) donnés dans un setting expérimental représentatif. Sur un point de vue statistique, cette approche expérimentale est particulièrement difficile, puisque c'est une expérience *in vivo* qui repose sur différentes variables potentiellement en interaction ; la tumeur, l'exercice physique et la dénervation. Par cette approche, nous avons calculé que 18 souris pour chaque bras de l'étude (donc  $18 \times 4 = 72$ , pour un double sens typique ANOVA avec quatre bras) sont nécessaires pour atteindre les différences attendues, avec un niveau de confiance de 95% et une puissance de 80. Ainsi, nous avons estimé à 72 le nombre de souris nécessaires pour chaque série d'expériences (procédure expérimentale). Nous avons développé un système de cultures cellulaires en présence de stimulation mécanique (myoblastes cultivés dans le FlexCell) en présence de cytokines recombinantes dans le milieu de culture pour mimer les cytokines pro-inflammatoires caractéristiques de la cachexie. Les effets d'une tumeur *in vivo* ne sont pas entièrement reproduits par les cytokines, donc *in vitro* on obtient des données préliminaires utiles à l'optimisation des expériences successives *in vivo*, mais ces dernières restent indispensables pour obtenir des données précliniques exploitables pour des mesures anti-cachectiques chez l'homme. Pour estimer le nombre minimum d'animaux nécessaire, nous avons effectué un calcul statistique itératif spécifié. Nous estimons avoir besoin de 468 souris au total pour l'ensemble du projet de quatre ans. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de déceler des signes de douleur notamment les souris porteuses de la tumeur avec éventuelle administration supplémentaire d'analgésiques (Buprénorphine). Nous avons défini les variables et la méthode d'évaluation quantitative du point limite au-delà duquel les animaux recevront un analgésique ou seront euthanasiés. Les outils statistiques et informatiques que nous mettrons en place nous permettront de réduire le nombre de manipulations en exploitant au mieux les données obtenues par chaque expérience. L'exercice physique, proposé dans ce projet, est une bonne pratique car il diminue (de façon systémique) l'inflammation et améliore l'état physique et donc le bien-être des animaux.

7158. Depuis 30 ans, la sélection de truies hyper prolifiques a conduit à une augmentation du nombre de porcelets nés à chaque mise-bas (environ + 5 porcelets sur la période).

Parallèlement à cette augmentation de la prolificité, on observe un accroissement de la mortalité des nouveaux nés (de 20 à 35% selon les modes d'élevage) qui s'explique principalement par une hétérogénéité des porcelets à la naissance trop grande.

Les porcelets les plus légers dits "chétifs" survivent difficilement aux 48 premières heures.

Dans le cadre de ce projet, nous allons tester une spécialité nutritionnelle commercialisée depuis 10 ans en France qui a pour objet d'homogénéiser le poids des porcelets à la naissance en optimisant l'ovulation, la fécondation et la nidation des embryons.

Le demandeur envisage un développement international de cette spécialité, ce qui nécessite de documenter les effets biologiques de la supplémentation.

2 lots de 30 femelles seront constitués, un lot supplémenté (E : essai), un lot sans supplémentation (T : témoin).

La supplémentation consiste en une distribution quotidienne de 17 grammes de la spécialité, en plus de la ration pour le lot E.

Cette spécialité, à base d'anti oxydant, non énergétique et non protéique, n'est pas compensée dans le lot témoin, la ration quotidienne est de 2.8 kgs d'aliment.

Afin de documenter l'impact hormonal du traitement, nous réaliserons des prises de sang sur 6 femelles dites sentinelles de chaque lot, 10 et 20 jours après l'insémination pour des dosages notamment de la progestérogène.

Ainsi, seulement 12 femelles feront l'objet de la demande d'autorisation éthique, les autres étant conduites selon les pratiques habituelles des élevages.

La règle des 3 R est prise en compte, afin de :

- raffiner les conditions d'élevage, les femelles seront libres de leurs mouvements et élevées sur une épaisse couche de paille. Ce substrat permet une activité de fouille et de comportement exploratoire, en conformité avec les recommandations de l'EFSA- autorité européenne de sécurité des aliments.

Les dosages de cortisol seront effectués sur des prélèvements de salives non invasifs.

- réduire, le sang de seulement 6 femelles par lot de 30 sera collecté, tout en conservant une puissance statistique pour cette étude.

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation animale pour mesurer les effets physiologiques du produit testé.

7159. Nous avons montré que dans deux cancers du sang, la leucémie aigue myéloïde (LAM) et de lymphome anaplasique à grandes cellules (LAGC) les longs ARN non codants et la tyrosine kinase oncogénique NPM-ALK respectivement sont des acteurs clés dans la genèse de ces cancers qui ont pour origine des cellules très immatures. Pour ces deux néoplasies nous ne disposons pas de modèles d'études *in vivo* pour étudier leur genèse. C'est dans ce contexte que nous souhaitons inoculer à des souris immunodéprimées des cellules humaines immatures exprimant fortement des longs ARN non codants que nous avons identifié ou la protéine NPM-ALK afin d'évaluer leur rôle dans le développement de la LAM et du LAGC respectivement. Pour réaliser ces expériences nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés en effectuant le plus de validation possible dans des modèles cellulaires *in vitro*. Nos expériences ont pour finalité l'amélioration de la santé humaine et l'expérimentation *in vivo* est non substituable à aucune autre méthode car nous avons besoin d'un organisme complet pour étudier le développement des tumeurs. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet ainsi d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié permettant de réduire sensiblement le nombre d'animaux utilisés. Ainsi 100 souris seront utilisées pour l'ensemble des expériences. Durant toute la période d'expérimentation, afin de limiter la souffrance des animaux, l'état général des animaux sera observé quotidiennement au cours des expérimentations et en cas de souffrance ils seront traités par analgésiques ou euthanasiés, si nécessaire. Le week-end le suivi des animaux sera assuré par les zootechniciens certifiés de la zootechnie. Un enrichissement de type carré de coton sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire une nidation. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3 R (remplacement, réduction et raffinement) et la directive européenne 2010/63/UE

7160. Le but du travail, dans le projet proposé, est de recréer la partie vivante (vascularisée et innervée) d'une dent (la pulpe dentaire), en utilisant des cellules souches localement présentes dans ce tissu (les cellules souches pulpaire [DPSC]) ensemencées dans un matériaux biologiques (matrices de collagène) entourées par une tranche de dent. Ce modèle sera réalisé par implantation sous-cutanée d'une pulpe dentaire équivalente sous anesthésie afin d'éviter des souffrances aux animaux. De plus, un protocole analgésique et un traitement antibiotique seront mis en place.

Après une période de 4 semaines, les animaux seront anesthésiés puis radiographiés par scanner à rayons X. Les tissus implantés seront prélevés puis fixés pour analyses ultérieures.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, 50 souris seront nécessaires en fonction des effets observés, ce qui permettra d'envisager une étude adéquate sur le plan statistique.

La régénération pulpaire présente une biologie complexe que l'on ne sait pas reproduire par ingénierie actuellement : participation de différents types cellulaires, apport de la vascularisation. Ces processus complexes ne peuvent être mimés en utilisant des boîtes de cultures ou par informatique. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives.

7161. La capacité de réaliser des mouvements latéralisés est un aspect important de nos activités quotidiennes. Les mouvements en miroir sont des mouvements involontaires survenant d'un côté du corps qui miment et accompagnent les mouvements volontaires contralatéraux. Les mouvements en miroir isolés (non associés à d'autres symptômes neurologiques) constituent une maladie rare à transmission autosomique dominante appelée mouvements en miroir congénitaux (MMC). Les patients atteints ne peuvent pas réaliser de mouvements unimanuels purs, et cette maladie représente donc un paradigme unique pour l'étude de la latéralisation motrice. Les patients MMC présentent des anomalies du faisceau corticospinal (FCS) et du corps calleux (CC). Chez la souris, nous souhaitons clarifier les mécanismes moléculaires et développementaux qui contrôlent le croisement de la ligne médiane par les axones corticospinaux et transcallaux, et déterminer dans quelle mesure le croisement normal des voies corticospinales et transcallaux contribue à la latéralisation du contrôle moteur.

L'IRM rongeur nous permettra d'étudier la connexion entre les deux hémisphères d'un point de vue anatomique et fonctionnel. L'utilisation d'IRM de diffusion nous permettra d'obtenir des informations sur l'anatomie du CC connectant les deux cortex moteur primaires, tandis que l'IRM fonctionnelle nous permettra d'évaluer la connectivité fonctionnelle entre les deux hémisphères.

Pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec la boisson et la nourriture ad libitum. Ils feront l'objet d'un contrôle quotidien par une personne compétente. Ces contrôles doivent permettre de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. Ces contrôles seront enregistrés.

Le nombre de souris utilisés dans ce projet sera de 30. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum ; 2) raffinement, la procédure ne devrait entraîner ni stress, fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de ces 2 faisceaux qui ne sont présents que chez les mammifères ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

7162. Malgré les grands progrès réalisés dans la prévention, le diagnostic et le traitement du cancer du sein, en France 54000 nouveaux cas ont été diagnostiqués chez les femmes en 2015 et environ 12000 en sont décédées. C'est une maladie très hétérogène, classée en plusieurs catégories prenant en compte les caractéristiques moléculaires, le stade d'évolution, la localisation de la tumeur et des tissus à partir desquels elle s'est développée. Le cancer du sein triple négatif (TNBC pour Triple-negative breast cancer) qui représente environ 15-25% de tous les cancers du sein, est un type de cancer particulièrement agressif et est associé à un mauvais pronostic. Il est caractérisé par la faible ou l'absence d'expression des récepteurs de l'estrogène et de la progestérone, ainsi que du récepteur Her-2 et de ce fait, les patientes atteintes de TNBC ne peuvent bénéficier de thérapies ciblées contre ces molécules. De plus, même si ces cancers peuvent répondre fortement aux autres chimiothérapies conventionnelles utilisées, ils présentent un risque très élevé de rechute et de dissémination métastatique.

Des études récentes menées dans notre laboratoire montrent qu'après traitement des patientes TNBC par chimiothérapie une réponse immunitaire peut se déclencher et induire l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes (TILs pour tumor infiltrating lymphocytes) et que la présence de ces TILs antitumorales était corrélée avec un bon pronostic de survie à 5 ans. Une analyse comparative du profil génomique de ces patientes a notamment mis en évidence un gène dont l'expression est fortement augmentée chez les patientes présentant peu d'infiltrats lymphocytaires, suggérant que la surexpression de ce gène pourrait inhiber l'attraction des cellules immunitaires dans les tumeurs.

Nos résultats préliminaires *in vitro* montrent que ce gène joue un rôle dans la sensibilité des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques. Nous souhaitons maintenant déterminer *in vivo* l'implication de ce gène dans l'inhibition de l'infiltration des cellules du système immunitaire dans les tumeurs. Pour ceci, la première étape a été de supprimer son expression dans la lignée de tumeur du sein murine 67NR. Nous souhaitons injecter ces cellules exprimant (67NR parentales) ou non (67NRko) le gène étudié dans des souris afin d'étudier *in vivo* si son expression est impliquée dans l'attraction des cellules immunitaires dans la tumeur. Une partie des souris sera traitée par chimiothérapie dès l'apparition des tumeurs. L'utilisation du modèle animal murin est le seul moyen d'étudier *in vivo* le rôle du gène étudié dans l'inhibition de l'infiltration des tumeurs par les lymphocytes et qui pourrait constituer une cible pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour les cancers de type TNBC.

Le projet nécessitera l'utilisation de 60 souris femelles. Ce nombre est requis pour atteindre la pertinence statistique et obtenir une réponse significative. Toutefois, si les expériences menées sur une première série de 10 souris dans chaque lot sont très concluantes et donnent des résultats significatifs et robustes le nombre de 15 souris par lot pourra être réduit. Les souris seront élevées et maintenues dans le souci de leur bien-être (milieux enrichis, surveillance quotidienne et précise des souris). Les souris seront euthanasiées selon des méthodes éthiques, réglementaires pour l'expérimentation, ou dès qu'elles auront atteint un point limite.

7163. Dans certaines maladies musculaires et nerveuses, le muscle diaphragmatique peut subir des lésions tissulaires et cellulaires altérant significativement son contrôle et/ou ses propriétés contractiles. Des lésions du diaphragme sont également observées chez certains patients après une longue période sous assistance respiratoire. L'objectif de ce projet est d'utiliser un outil optogénétique, qui par sa présence dans les cellules musculaires diaphragmatiques, permettra de les stimuler (et par voie de conséquence les faire se contracter) grâce à une stimulation lumineuse. Ce stimulus permettra au muscle diaphragmatique de fonctionner indépendamment des mécanismes de stimulation naturels défaillants dans certaines pathologies et ainsi de les compenser. Des travaux précédents ont montré que cette approche sur des tissus contractiles excitables fonctionnait *in vivo* dans le muscle et le cœur de rat, ouvrant des perspectives thérapeutiques permettant d'atténuer l'atteinte fonctionnelle de tissus malades ou de leur commande nerveuse. Le modèle animal choisi pour cette étude est la souris mdx, modèle murin de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) dont la capacité contractile du diaphragme est significativement altérée et conduit à des troubles respiratoires et cardiovasculaires importants chez les patients DMD. Cependant, une première phase expérimentale sur le rat sera nécessaire pour mettre au point la technique sur un animal dont la taille facilite l'accès au diaphragme. L'étude des propriétés contractiles du diaphragme et de sa sensibilité à la lumière (capacité à entraîner les contractions diaphragmatiques par des pulses lumineux) sera réalisée *in vivo* par l'approche d'une fibre optique par la cavité abdominale et *ex vivo* après euthanasie de l'animal et prélèvement du diaphragme. Pour réaliser ces expériences, seront utilisés 120 animaux (2 lots de 20 rats et 4 lots de 20 souris). La taille des lots a été fixée de façon à trouver un compromis entre utiliser le moins d'animaux possible et assurer une significativité des résultats permettant d'être confiant dans les résultats obtenus. La règle des 3R sera mise en application de la façon suivante : Remplacement : il n'est pas possible de satisfaire au critère de Remplacement des animaux par d'autres préparations biologiques puisque l'objet de l'étude est justement de tester la commande *in vivo* du diaphragme par la stimulation lumineuse. Réduction : Réduction au minimum du nombre d'animaux tout en gardant ce nombre suffisant pour obtenir des résultats significatifs. Raffinement : à la fois des conditions d'hébergement des animaux (ambiance améliorée, par exemple diffusion à bas niveau de musique douce) et du protocole expérimental (par exemple surveillance renforcée, attention particulière aux signes pouvant indiquer une douleur de l'animal et limitation de la durée expérimentale à 1h).



Une surveillance et une observation quotidienne du comportement des animaux sont assurées et une pesée hebdomadaire permettra de s'assurer de la bonne santé des animaux durant l'ensemble du protocole.

7164. L'objectif de ce projet est de valider le concept que l'inactivation du gène *Ophn1* chez la souris (souris *Ophn1*-KO) constitue un modèle murin de stress post-traumatique, et d'évaluer les effets du fasudil déjà utilisé au Japon pour traiter les maladies cérébro-vasculaires. Ce modèle murin présente des déficits comportementaux qui sont réduits par le fasudil. Parce qu'il s'agit justement d'une vieille molécule (repositionnement de médicament) avec du recul dont on sait qu'elle a peu d'effets secondaires chez l'homme et la souris, qu'elle passe la barrière hémato-encéphalique, que son utilisation a déjà fait partiellement ses preuves dans les études précliniques du modèle *ophn1*. Pour finir la propriété intellectuelle de cette molécule tombe cette année donc elle sera utilisable partout à condition qu'une entreprise prenne en charge sa production. En terme comportemental, le déficit d'extinction dans le test de peur émotionnelle conditionnée (« fear conditioning ») reflète une résistance à l'oubli d'une expérience négative, et peut être utilisé pour modéliser le stress post-traumatique. Par ailleurs, la souche 129S1/Sv1mJ manifeste un déficit d'extinction dans ce type de test et constituera un modèle de référence dans ce projet. D'autre part, la fluoxétine, un antidépresseur, facilite l'extinction de la peur émotionnelle conditionnée.

La souris est largement utilisée comme modèle animal pour l'évaluation des processus comportementaux. Par ailleurs, il reste de nos jours le modèle de choix pour reproduire des mutations génétiques humaines afin d'en étudier les conséquences et de rechercher de nouveaux traitements pour les maladies neurologiques et psychiatriques.

Les personnes impliquées possèdent des autorisations d'expérimenter chez les rongeurs, et connaissent très bien les règles et appliquent les recommandations éthiques pour limiter la souffrance des animaux.

Nous utiliserons le test de « fear conditioning » pour évaluer la mémoire émotionnelle, et par conséquent la résistance à l'oubli d'une expérience négative comme modèle de stress post-traumatique.

#### Réduction/Raffinement

Nous utiliserons 180 souris en tout (12 animaux par génotype et par traitement). Dans les études comportementales, cet effectif est suffisant pour montrer une différence statistique entre les groupes expérimentaux, si elle existe.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux. Aucun phénotype douloureux majeur n'est attendu.

Par ailleurs, des analyses statistiques appropriées seront utilisées pour optimiser l'utilisation des animaux.

#### Remplacement

En l'état actuel des connaissances, les processus comportementaux tels que l'apprentissage, la mémorisation, ou les comportements relevant de la psychiatrie ne peuvent pas être étudiés par des études *in silico* ou *in vitro*.

L'objectif majeur de ce projet est de montrer que la voie de signalisation moléculaire régulée par la protéine *Ophn1* pourrait être une cible thérapeutique pour le traitement de troubles émotionnelle tels que le stress post-traumatique.

7165. La tétraploïdie est une aberration génétique survenant dans les premiers stades du cancer. Cette modification conduit à la formation de cellules ayant doublé leur nombre de chromosomes et qui sont dans un état intermédiaire entre la diploïdie (cellules avec un contenu en chromosomes normal) et l'aneuploïdie (cellules que ne possèdent pas le nombre normal de chromosomes) caractéristique des cellules tumorales de mauvais pronostic. Nous avons démontré que les cellules tétraploïdes (cellules présentant le double de chromosomes que la normale) cancéreuses sont plus résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie comparativement aux cellules diploïdes cancéreuses. De plus, nous avons prouvé que le système immunitaire peut reconnaître et détruire les cellules tétraploïdes, empêchant ces cellules génératrices de cancer de se propager et de générer des cellules aneuploïdes. Néanmoins, les facteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans cette reconnaissance ne sont pas encore élucidés.

Ce projet vise à étudier quels sont les effecteurs cellulaires et moléculaires spécifiques du système immunitaire impliqués dans la reconnaissance de cellules tétraploïdes précurseurs du cancer, notamment de cellules provenant de cultures primaires du cancer de sein. Pour se faire, nous induirons l'apparition du cancer mammaire (par administration combinée d'une hormone et d'un carcinogène chimique) chez des souris présentant un système immunitaire intact mais aussi chez des souris mutantes présentant une immunodéficience.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. Etant donné que l'objectif de notre travail est d'identifier les effecteurs du système immunitaire responsables de la reconnaissance des cellules cancéreuses, notamment des cellules tétraploïdes précurseurs du cancer, nous avons absolument besoin de réaliser des expériences dans un organisme entier vivant (présence de toutes les interactions immunitaires et humorales). Plus particulièrement, nous utiliserons un modèle de carcinogénèse de glande mammaire chez des souris immunocompétentes ou immunodéficientes.

Ce projet se déroulera sur 5 ans, et il nécessitera 765 souris (et au maximum 1530, si nous avons besoin de doubler certains groupes de la procédure). Ce nombre d'animaux se justifie par la grande diversité de facteurs cellulaires et moléculaires du système immunitaire à étudier. Nous allons utiliser des souris déficientes pour chacun de ces facteurs et/ou nous allons les inhiber de façon chimique chez des souris immunocompétentes. Des souris contrôles seront utilisées pour montrer l'efficacité de nos modèles.

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Ces expériences ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, l'objectif de notre travail est d'étudier la relation entre la tétraploïdie et sa reconnaissance par le système immunitaire dans le développement du cancer, à l'aide notamment d'un modèle de carcinogénèse des glandes mammaires. A ce jour, un organisme entier, vivant, proche de l'homme, présentant un système immunitaire complet et porteur de tumeurs ne peut être reconstitué *ex-vivo* du fait de sa complexité. Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de

statistiques. Le nombre de souris par lot a été calculé par des méthodes de calcul de puissance (avec un seuil de 5% et une puissance de 90%). Enfin, nous pourrions utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris. De plus, nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'angoisse (présence, dans les cages, de coton pour la formation de nids). Les animaux immunodéficients seront hébergés dans des portoirs ventilés en conditions stériles. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Les animaux recevront une alimentation adaptée à leur condition (alimentation enrichie, accès très facile, digestibilité importante) dès apparition des signes associés à la carcinogénèse (excroissance des glandes mammaires).

7166. L'épilepsie est une affection neurologique grave qui touche près de 1% de la population française. Les crises d'épilepsie se caractérisent par une activité cérébrale anormale, excessive ou hypersynchrone.

Au niveau histologique cette pathologie est associée à une inflammation du tissu nerveux, particulièrement au niveau de l'hippocampe. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études se sont portées sur l'élucidation du rôle potentiel des processus immunitaires et inflammatoires dans les épilepsies. L'utilisation de modèles animaux a permis de mettre en évidence qu'il existe un lien bidirectionnel entre activité épileptique et inflammation. Ainsi l'inflammation peut à la fois être une conséquence mais aussi une cause des crises en contribuant au développement de l'épilepsie après un événement initiateur. En fait, le rôle des médiateurs de l'inflammation dans l'épilepsie semble complexe puisqu'il a aussi été montré que l'activation de certains types particuliers de médiateurs peut avoir des effets neuroprotecteurs. L'un des médiateurs importants de cette inflammation sont les cellules microgliales qui représentent les macrophages résidents du système nerveux central.

Notre équipe de recherche a récemment montré que l'induction d'un état de mal épileptique chez la souris s'accompagne d'une modification des voies de signalisation impliquant les récepteurs purinergiques. En particulier nous avons montré qu'un de ces récepteurs, dont l'expression est induite dans les microglies dans des conditions inflammatoires, participe à la régulation de l'activation des microglies et pourrait représenter une cible thérapeutique dans cette pathologie.

L'objectif de la présente étude est d'utiliser des lignées de souris génétiquement modifiées (dont la plupart sont déjà présentes dans l'établissement utilisateur) pour déterminer par quels mécanismes moléculaires les récepteurs P2X4 et P2X7 sont impliqués dans la régulation de l'activation microgliale.

Pour respecter la règle des 3R, les animaux utilisés dans cette étude seront élevés en présence de congénères de même sexe et de même âge pour limiter leur angoisse. Leur environnement d'élevage et d'hébergement sera enrichi de copeaux et de « maisons ». Les procédures expérimentales utilisées sont de classe modérées ou sans réveil. Pour les procédures modérées, notamment les procédures chirurgicales, la douleur des animaux sera prévenue par l'utilisation d'analgésiques.

Pour restreindre le nombre d'animaux, les cerveaux des animaux seront séparés en 2, une partie servira pour les études histologiques et l'autre partie pour les études biochimiques ou de biologie moléculaire. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera donc d'environ 500 souris.

7167. L'objectif principal est de fabriquer des milieux de culture (exemple gélose Columbia, Chocolat...) et des réactifs pour le diagnostic biologique dans l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire. La culture des micro-organismes nécessite des milieux contenant des hématies intègres et / ou des éléments nutritifs du sang dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce. Il n'existe pas de molécule similaire et performante aux caractéristiques des globules rouges et dérivés du sang.

Les sangs des différentes espèces sont utilisés pour la production de réactifs de diagnostic *in vitro* au moyen de méthodes reconnues ; ces réactifs permettent l'évaluation ou la détection ou le contrôle des modifications physiologiques chez l'homme pour les pathologies suivantes :

- Amibiase, infection parasitaire du gros intestin
- Identification de bactéries associées à différentes pathologies d'origine bactérienne
- Mononucléose infectieuse
- Toxoplasmose
- Cancers
- Hépatite B
- HIV anticorps et antigène
- Différentiation infection bactérienne ou virale pour antibiothérapie
- Hormones de la reproduction
- Bilan martial
- Rougeole
- Marqueurs de l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque
- Syphilis
- Détection/recherche de divers virus

Les produits biologiques (sang et sérum animal) sont évalués au niveau des analyses de risque produit comme des composants critiques qui ne peuvent pas être remplacés sans repasser par des phases de développement pour l'ensemble de ces réactifs ; il n'existe pas de solutions identifiées permettant d'en réaliser la substitution dont la validation serait de toute façon prohibitive.

Ces sangs peuvent être également utilisés pour d'autres applications telles que l'alimentation d'insectes piqueurs hématophages (tiques, moustiques...), dans un but de recherche sur les maladies transmissibles à l'homme ou aux animaux par ces insectes.

Ce sang est prélevé sur des animaux "donneur" qui ne subissent aucun autre protocole (pas d'administration, ni injection de quelque substance).

Ce projet rassemble 8 espèces animales à raison de 3500 ovins, 125 équins, 45 caprins, 6 bovins, 5 porcs, 40 volailles, 15 cobayes. L'effectif des animaux donneurs est adapté au plus juste pour répondre aux prévisions de production.

Toutes ces espèces sont hébergées en groupe, ceci leur assurant une vie sociale adaptée à l'espèce et garantissant un enrichissement efficace.

7168. Les microglies sont des cellules immunitaires du cerveau. Elles jouent un rôle essentiel dans les processus neuroinflammatoires. Dans la Maladie d'Alzheimer (MA), elles ont des effets à la fois bénéfiques et délétères. Ces effets à double tranchant sont probablement associés à des sous-types distincts de microglies.

Le rôle de ces cellules, ultra-sensibles à leur environnement, est difficile à étudier dans la mesure où les procédures expérimentales pour les isoler ont une incidence directe sur leur état physiologique. Grâce à l'utilisation d'une lignée murine spécifique, nous pouvons en utilisant la technique de microdissection laser, visualiser et isoler ces cellules à partir de coupes de tissus intacts sains ou pathologiques. Nous avons aussi développé des approches de biologie moléculaire pour établir le répertoire des gènes exprimés par ces cellules à partir d'un faible nombre de cellules.

Pour réduire le nombre total de souris, les animaux utilisés pour la caractérisation comportementale seront ensuite utilisés pour les analyses biochimiques ou immunohistochimiques. Dans la mesure du possible, les souris seront élevées dans des cages regroupant plusieurs individus afin de diminuer l'angoisse des animaux. De même, la litière sera enrichie de copeaux. Les procédures expérimentales qui seront utilisées sont de classe légère ou sans réveil. Par ailleurs dans un souci de raffinement, les animaux seront étudiés avant l'apparition du phénotype dommageable.

Le besoin en souris a été estimé à 380 sur l'ensemble de l'étude.

7169. Choisir avec soin le modèle animal utilisé pour des principes actifs très peu solubles dans l'eau et souvent peu stables et peu biodisponibles, il est nécessaire de développer de nouveaux excipients adaptés. Ces excipients présentent un rôle de matrice permettant la dispersion du principe actif afin d'améliorer la solubilité, la biodisponibilité et le maintenir dans un état amorphe. Dans ce cadre, un polymère de cyclodextrines (polyCD) a été développé (brevet : WO 00/047630). Il possède à la fois des propriétés texturants et protecteur de principe actif par la formation de complexes d'inclusion via cyclodextrine. Pour l'évaluation de l'innocuité de l'excipient et l'obtention de l'approbation réglementaire, le recours à des modèles *in vivo* est nécessaire. Ce projet ici présenté vise à évaluer la toxicité générale aiguë chez le rat et définir la dose sans effets observables (NOEL) et la dose sans effets toxiques observables (NOAEL) par une administration per os. Et ainsi à étudier l'influence d'excipient sur les profils pharmacocinétiques d'ibuprofène chez le rat. L'ensemble de l'étude utilisera 48 rats (6 rats / groupe). Le raffinement est aussi notre préoccupation permanente tout au long de la vie des animaux et pendant les différentes étapes du protocole expérimental. Le modèle animal utilisé a été choisi avec soin. Les animaux sont entraînés à coopérer pour certaines procédures (comme prélèvement de sang) de manière à diminuer le stress de l'animal. Les points limites sont établis et appliqués les plus précoces possibles pour éviter la douleur et la souffrance. La méthode choisie pour le prélèvement multiple de sang par cathéter veineux fémoral pendant l'expérimentation est plus raffinée que les autres méthodes. La durée de cette étude a été réduite au maximum, et les procédures d'euthanasie appropriées vont être utilisées. Les résultats obtenus lors de l'expérimentation vont être exploités au mieux (ex. études statistiques) pour le raffinement.

7070. La thérapie génique est une stratégie innovante de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans les cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs viraux, et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAVr peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Néanmoins, malgré des succès récents, un des facteurs majeurs limitant l'efficacité du transfert de gène *in vivo* à l'aide d'AAVr dans les essais cliniques provient de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur. Dans certains cas, celle-ci est responsable de la destruction des cellules transduites, annihilant de fait tout bénéfice de la thérapie génique. L'occurrence de cette réponse immunitaire délétère s'explique par le fait que les hommes sont naturellement infectés au cours de leur vie par des virus AAV sauvages (virus qui ne sont par ailleurs à ce jour associés à aucune pathologie chez l'homme). Les individus ainsi infectés développent un pool de lymphocytes T (LT) CD8+ spécifiques de la capsid de l'AAV. Or, la capsid du vecteur AAVr étant similaire à celle de l'AAV sauvage, les clones mémoires de LT CD8+ spécifiques de la capsid sont susceptibles d'être réactivés lors d'un transfert de gène à l'aide d'AAVr et peuvent potentiellement détruire les cellules transduites qui présentent à leur surface des épitopes dérivés de la capsid de l'AAVr (suite à la dégradation de la capsid par le protéasome cellulaire après entrée du vecteur). Le déclenchement ou non de cette réponse immunitaire cellulaire anti-capsid semble être dépendante de nombreux facteurs (voie d'administration de l'AAVr, dose injectée, tissu ciblé, transgène thérapeutique apporté...) et son impact sur le transfert de gène reste à ce jour difficile à appréhender. En effet, les modèles *in vitro* ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et le patient humain, et les modèles animaux de transfert de gène disponibles à ce jour ne récapitulent pas toujours les observations faites chez l'homme. L'objectif de ce projet est d'élucider l'impact des LT CD8+ humains spécifiques de la capsid de l'AAV sur le transfert de gène. Dans cette optique, un modèle *in vitro* ne peut pas remplacer un modèle animal. L'utilisation de la souris est ici justifiée à la fois par l'existence de plusieurs modèles de souris humanisées permettant le transfert adoptif efficace de lymphocytes humains, ainsi que par la possibilité de constituer des groupes

d'animaux suffisamment larges pour pouvoir effectuer des calculs statistiques. En comptant les groupes contrôles, nous avons estimé que nous aurons besoin d'au plus 360 souris pour l'expérimentation. Les groupes seront constitués et analysés séquentiellement, afin de Réduire le nombre d'animaux utilisés. Les protocoles envisagés, à savoir transfert adoptif de lymphocytes humains et administration d'AAVr, sont des procédures ayant déjà été réalisées dans des modèles murins avec une bonne tolérance générale. Une courbe de poids hebdomadaire ainsi qu'une inspection visuelle quotidienne des animaux seront réalisées. Tout signe clinique notable sera suivi par l'expérimentateur afin de Raffiner la méthodologie expérimentale.

7071. Notre laboratoire est engagé dans des programmes de recherches ayant pour but principal de découvrir et de développer de nouveaux médicaments pour lutter essentiellement contre les maladies de la sphère gastro-intestinale d'origine métabolique ou inflammatoire.

Le processus de développement prend donc naissance au laboratoire de chimie par l'invention puis la synthèse de nouvelles molécules innovantes.

Les propriétés physico-chimiques des composés sont étudiées, leurs potentielles caractéristiques de futur médicament sont évaluées par des mesures d'activité dans des modèles *in tubo* ou *in vitro* avant qu'il soit décidé de les évaluer chez l'animal.

Avant même de pouvoir étudier l'efficacité intrinsèque des molécules dans un modèle animal affecté d'une pathologie précise, il est nécessaire de savoir comment la molécule se comporte une fois administrée à un organisme vivant. C'est-à-dire quelle sera son devenir dans un organisme dans lequel elle est administrée.

Pour être efficaces, les molécules doivent pouvoir atteindre leur organe-cible, une fois administrées à un être vivant, que ce soit par voie orale ou par injection, les molécules subissent des modifications chimiques, elles sont véhiculées, stockées ou éliminées. Toutes ces différentes étapes caractérisent le futur médicament et constituent les critères qui doivent être étudiés *in vivo*.

Le projet décrit ici a donc pour objectif de détailler des procédures expérimentales (pharmacocinétiques chroniques et d'interaction) qui permettent d'étudier la vitesse de transformation d'une molécule administrée (absorption, métabolisation et élimination).

Le but étant de vérifier si cette transformation n'est pas modifiée au fur et à mesure des jours de traitement (accumulation du produit pouvant conduire à une toxicité ou dégradation accélérée pouvant conduire à une perte d'efficacité de la molécule) dans le cas des pharmacocinétiques et si un prétraitement avec une autre molécule, dans des combinaisons thérapeutiques, ne conduit pas également à une modification de cette transformation pour les études d'interaction.

Ces procédures préalables, nécessitent peu d'animaux au regard de l'ambition des programmes menés, ils permettent d'ajouter un filtre supplémentaire dans notre arbre de sélection des nouvelles molécules qui seront destinées aux études d'efficacité chez l'animal. Cela permet par voie de conséquence de réduire considérablement le nombre global d'animaux utilisés pour ces développements, ceci en respect de la règle des 3R's qui dicte l'expérimentation animale. Les études pharmacocinétiques produisent un inconfort modéré aux animaux qui les subissent, il est cependant mis en œuvre toutes les mesures qui permettent de diminuer le stress et la douleur notamment l'anesthésie si elle s'avère nécessaire.

L'ensemble des procédures décrites dans ce projet appliquées à des petits rongeurs (rats et souris dans notre cas) nécessitera l'emploi de 6040 rats et 6040 souris, soit 12080 animaux pour la durée de 5 années que couvre ce projet.

7072. L'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence et la troisième cause de mortalité : c'est donc un enjeu majeur de santé publique. Dans 85% des cas, l'AVC est d'origine ischémique, c'est-à-dire qu'il provient d'une occlusion artérielle aiguë. L'ischémie cérébrale s'associe à une réaction inflammatoire qui contribue aux dommages cérébraux de manière significative.

Le suivi par imagerie *in-vivo* de cette réaction inflammatoire permettrait de mieux comprendre sa dynamique spatio-temporelle et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à moduler cette réaction.

Pour cela, nous proposons de développer une approche en imagerie *in-vivo* multimodale basée sur l'administration d'un agent de contraste qui cible spécifiquement la réaction inflammatoire chez le petit rongeur présentant un AVC ischémique. Les modalités d'imagerie seront les mêmes que celles utilisées chez l'homme : imagerie par résonance magnétique (IRM), scanner X (tomodensitométrie ou TDM) et tomographie par émission de positons (TEP).

L'objectif général de ce projet, d'une durée de 5 ans, est de générer un signal spécifique dans les régions du cerveau présentant une forte réaction inflammatoire, ce qui ouvrirait la voie à son suivi non-invasif de l'inflammation dans l'ensemble du cerveau, à des fins de diagnostic et de suivi de traitement.

Le but à plus long terme est de transférer ces méthodes chez l'Homme, pour une meilleure prise en charge des patients présentant un AVC.

Le nombre d'animaux maximum sera de 1654 ; rongeurs rats et souris, ils seront utilisés pendant les 5 années du projet pour répondre aux objectifs de ces développements de méthodologie d'imagerie *in-vivo*.

- 1) Mieux comprendre la physiopathologie de l'AVC,
- 2) Mieux évaluer de nouveaux traitements anti- inflammatoires au stade préclinique, afin de sélectionner les meilleurs candidats pour les essais cliniques,
- 3) Pouvoir proposer, dans quelques années, des agents de contraste utilisables chez l'homme et dont l'imagerie sera un apport pour le diagnostic, la compréhension physiopathologique et l'évaluation thérapeutique de l'AVC.

Quand cela est possible, les agents de contraste seront d'abord testés dans un modèle d'ischémie cérébrale *in-vitro* (culture cellulaire de macrophages ou de cellules endothéliales cérébrales soumises à une privation temporaire en glucose et en oxygène). Si la règle de remplacement ne peut pas être mise en place, la règle de réduction du nombre d'animaux est entièrement appliquée. En effet, l'avantage de l'imagerie *in-vivo* est qu'elle permet des études sur l'animal vivant plutôt que d'avoir à mettre à mort les animaux à

intervalles donnés pour faire la même observation. Chaque animal est son propre contrôle, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique des résultats tout en limitant le nombre d'animaux. L'imagerie est réalisée sous anesthésie gazeuse. L'introduction d'agents de contraste est un outil important car ils permettent de faire ressortir le phénomène cellulaire ou moléculaire d'intérêt (inflammatoire). Pour l'imagerie in-vivo, l'administration de l'agent de contraste est réalisée dans la majorité des cas par voie veineuse périphérique, comme chez les patients, ce qui limitera les procédures invasives.

De plus, toujours dans un souci de réduction du nombre d'animaux et de raffinement des procédures, les mesures suivantes visent seront appliquées :

- La taille des effectifs est calculée a priori, en fonction de l'effet attendu,
- Les expérimentations sont réalisées en aveugle et en randomisant les produits administrés (agents de contraste et/ou agents thérapeutiques) comme dans les essais cliniques,
- Les paramètres physiologiques appropriés (poids, température, capnie, respiration...) sont mesurés tout au long du protocole,
- Pour les essais thérapeutiques, deux critères d'évaluations seront appréciés : la réponse neurofonctionnelle et la taille de la lésion. Les biomarqueurs d'imagerie sont inclus pour évaluer 1) si la cible thérapeutique est bien exprimée (diagnostic) et 2) si la cible thérapeutique est bien modifiée par le traitement (suivi de traitement). Le développement de ces biomarqueurs d'imagerie constitue le cœur de ce projet de recherche,
- Utilisation de cages enrichies (igloo, tunnel, bâton à ronger) où les rongeurs sont hébergés en colonies de 5 à 7 animaux,
- Utilisation d'analgésique morphinique pour le contrôle de la douleur.

7073. Le but de ce projet est de permettre à une équipe de mettre en place la technique chirurgicale dite de « Plug-Unplug » en utilisant le modèle primate non humain. La mise au point de cette méthode chez le primate permettra de proposer cette technique chirurgicale en France (uniquement proposée par une seule équipe chirurgicale en Europe pour le moment).

Cette technique permet la prise en charge anté-natale de la hernie diaphragmatique chez les fœtus ayant un pronostic vital défavorable du fait d'une hypoplasie pulmonaire sévère. Elle consiste en la pose d'un micro-ballonnet dans la trachée du fœtus (plug) afin de forcer le développement des poumons par l'accumulation des productions pulmonaires puis au retrait (« unplug ») de ce micro-ballonnet avant la naissance. Le nombre de cas de hernies diaphragmatique est estimé à 400/an en France.

Le but de cette saisine et de prolonger l'autorisation obtenue en 2013. Les premières chirurgies (2009-2013) ont permis aux chirurgiens de s'approprier le modèle puis de réaliser le geste d'intubation du fœtus avec succès lors de plusieurs interventions.

Depuis 2013, Plusieurs interventions ont permis de déposer puis retirer un ballonnet avec succès. Cependant plusieurs nouvelles problématiques sont apparues nécessitant le prolongement de l'autorisation et l'utilisation d'animaux supplémentaires. Ces problématiques sont (i) une difficulté plus grande que prévu à l'extraction du ballonnet, (ii) la trachée des fœtus d'une des 2 espèces utilisées dans le projet précédent (*Macaca fascicularis*) s'est révélée trop étroite pour la pose et le retrait du ballonnet. Dès que ce constat a été fait seule la deuxième espèce a été utilisée mais le nombre d'individu était insuffisant pour atteindre le nombre d'opération prévu lors de la dernière demande (12 animaux utilisés sur les 20 prévus).

La suite du projet nécessite encore la réalisation d'une quinzaine d'interventions pour permettre aux chirurgiens de maîtriser complètement le geste de pose et surtout de retrait du ballonnet, et ainsi finir de mettre en place cette technique. La mesure des poumons avant et après la pose du ballonnet, le prélèvement des liquides amniotiques et pulmonaires ainsi que la mesure d'élasticité des poumons permettront d'approfondir les connaissances scientifiques sur l'effet de la pose des ballonnets. Le geste sera réalisé sur 15 macaques (*Macaca mulatta*) gestantes dans le 3ème tiers de la gestation (soit 30 animaux impliqués : 15 femelles et 15 fœtus). Après le retrait du ballonnet, la gestation poursuit son cours sans impact sur le futur du bébé. Le modèle « primate non humain » est le seul modèle pertinent grâce à la similarité avec l'Homme de ses organes respiratoires et reproducteurs.

Dès que le geste sera parfaitement maîtrisé par les chirurgiens, la collecte de donnée sera stoppée ainsi que les chirurgies, réduisant le nombre d'animaux nécessaires au nombre optimal.

La femelle gestante est remise dans son groupe social dès son réveil de chirurgie. De plus, l'utilisation de l'endoscopie, les protocoles d'anesthésies et d'analgésies aussi bien généraux que locaux permettent de réduire au minimum le mal être de l'animal en raffinant au maximum chaque étape du protocole.

7074. Dans le cadre de la lutte anti nuisible contre les rongeurs sauvages dans le domaine de la santé publique, il est nécessaire de développer des rodenticides efficaces permettant une réduction des populations de rongeurs sauvages sur des exploitations agricoles ou non, sans apparition de résistance ni d'intoxications secondaires (effets indésirables sur les prédateurs naturels de ces espèces), mais le plus appétant possible (très bonne consommation du produit par les rongeurs face à une concurrence alimentaire importante) pour le rongeur et non l'environnement.

Pour cela, les industriels ont mis au point des produits de type anticoagulant car ces produits sont de loin les plus utilisés en Europe, car ils produisent une mort sans douleur excessive et ils peuvent être traités médicalement en cas d'intoxication accidentelle chez l'homme ou l'animal domestique.

Au-delà de l'analyse *in vitro* des effets moléculaires des substances testées, le recours à des études sur rongeurs vivants est indispensable pour analyser l'aspect comportemental. Les souches de laboratoire des espèces utilisées, rat brun et souris, sont les cibles principales. Les tests envisagés respectent les normes internationales propres à ce domaine d'activité.

Le projet utilisera un nombre total de 200 rats et 400 souris : ce nombre est calculé sur une prévision de 20 études par an pour le test de produits nouveaux par comparaison aux produits de référence. Chaque étude impliquera des groupes de 20 souris et 10 rats, ce qui est le minimum défini par les normes pour détecter une différence significative.

Afin de rester dans des conditions de bien-être animal (surtout dans le cadre des rats qui devront être en cages individuelles) et ne pas modifier le comportement biologique de l'animal, des procédures d'enrichissement sont mises en place (présence de cartons dans les cages...).

Il existe 2 types de tests aujourd'hui concernant les biocides de types anticoagulants.

Le premier, le test d'appétence, concerne l'étude d'appétence d'un produit (avec matière active ou sans matière active). Celui-ci peut s'effectuer sur 20 souris (*Mus musculus*) ou 10 Rats (*Rattus norvegicus*). Il se présente sous la forme de mesures de consommations journalières individuelles (Rat) ou collectives (Souris) du produit par rapport à de la nourriture standard de laboratoire. Un rapport des consommations est ensuite effectué afin de savoir quel est la nourriture la plus consommée. Les dommages dans ces études sont minimes car le produit ne contient pas de matière active, mais ils peuvent être importants quand le produit contient de la matière active qui produit des effets toxiques (nous serons dans une étude couplée à une efficacité comme défini dans le paragraphe ci-dessous).

Le second, le test d'efficacité, met à disposition des animaux le produit contenant la matière active pendant un jour et un suivi clinique quotidien des animaux est effectué sur les 17 jours suivants (les animaux recevant à nouveau l'alimentation normale). L'objectif même des études peut conduire à des dommages, puisque des signes d'intoxication modérée ou sévère pourront apparaître durant cette période : la comparaison des produits se fera sur la base du recueil précoce des observations pertinentes (effets cliniques attendus ou nouveaux). Il convient toutefois de préciser que la mort par intoxication avec un anticoagulant est précédée d'une phase de perte de conscience sans manifestation douloureuse, et que donc la souffrance ressentie par les animaux dans les procédures reste acceptable. Afin de réduire les effectifs utilisés, les tests d'appétence puis d'efficacité pourront être conduits sur les mêmes animaux en prévoyant une phase de récupération (et les produits non concluants en terme d'appétence ne seront pas soumis à un test d'efficacité). Afin de raffiner les procédures, les animaux seront hébergés en groupe (sauf phase de mesure de la consommation alimentaire individuelle, ils seront placés dans un environnement enrichi, et le suivi clinique sera renforcé lors de phases critiques. Des points limites adaptés seront appliqués dans tous les tests pour euthanasier un animal par surdosage anesthésique au cas où un produit entraînerait une dégradation excessive de l'état général ou du comportement.

7175. Objectif du projet : Évaluer l'activité anti-inflammatoire et/ou immuno-régulatrice de nouvelles entités chimiques après administration par voie topique ou systémique chez le rongeur.

Avantages : Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de démontrer les propriétés anti-inflammatoires et/ou immuno-régulatrices *in vivo* des composés évalués. Les données ainsi obtenues contribueront au profilage et à la sélection de molécules candidates à utiliser chez l'homme pour le traitement de désordres cutanés présentant un état inflammatoire aigu ou chronique de la peau ; tels que l'érythème solaire, l'acné, la rosacée, le psoriasis, la dermatite atopique.

Dommages escomptés : Des stimuli (agents physiques comme les UV ou agents chimiques ou biologiques comme des produits sensibilisants) sont utilisés pour induire un état inflammatoire aigu ou chronique de la peau chez le rongeur. Des animaux génétiquement modifiés et exprimant un phénotype particulier avec la présence d'un état inflammatoire de la peau et/ou d'un dérèglement de la réponse immune ou d'une altération de la fonction barrière de la peau peuvent également être utilisés comme modèles d'inflammation pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire et/ou immuno-régulateur des nouvelles entités chimiques. Ces lésions inflammatoires de la peau chez les animaux génétiquement modifiés ou les lésions induites par des stimuli sont susceptibles d'entraîner un certain niveau d'inconfort pour les animaux (par exemple: démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau). Cet inconfort pour l'animal sera maîtrisé par le choix des doses du stimulus utilisé et par le recours à un produit analgésique si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions complexes de la régulation de la réaction inflammatoire et de la réponse immune adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces : Les espèces rats et souris seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur le système immunitaire de ces modèles ; de l'existence des outils d'analyses *ex vivo* spécifiques de ces espèces comme par exemple des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes; et en raison de la possibilité d'obtenir des modèles particuliers d'inflammation de la peau par modification du génome (espèce souris essentiellement). La réalisation de xénogreffe nécessite l'utilisation d'animaux immunodéficients.

-Nombre d'animaux : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées (immunologie, biochimie, biologie moléculaire, morphologie, etc...) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, 3 à 10 animaux par groupe expérimental seront utilisés pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés. Pour chaque procédure expérimentale, le nombre optimum d'animaux par groupe expérimental sera défini par une approche statistique adaptée.

un maximum de 215 études par an sera réalisé et un maximum 112350 animaux (108975 souris et 3375 rats) sera utilisé sur une période de 5 ans.

-Conditions d'hébergement et de soins: Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux. L'hébergement est enrichi par la mise en œuvre de techniques d'enrichissement adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux (ex : présence de tunnel dans la cage). La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

7176. Notre étude s'intéresse à une maladie neurologique rare qui est caractérisée par une dégénérescence des neurones du cervelet. Les symptômes associés sont des troubles de l'équilibre et de la coordination conduisant à un handicap sévère en quelques mois. Elle touche principalement des femmes atteintes d'un cancer gynécologique (ovaire, sein). Chez ces patientes, le système immunitaire normalement responsable de détruire la tumeur, s'attaque également aux neurones du cervelet et les détruit. Le diagnostic est confirmé par la détection d'anticorps présents dans le sang et dans le cerveau dont la caractéristique est de reconnaître les neurones du cervelet.

Au laboratoire nous avons identifié 2 protéines ciblées par le système immunitaire. Ces 2 protéines sont normalement présentes chez l'homme dans les neurones du cervelet. Or chez les patientes elles sont également présentes dans la tumeur et semblent responsables de l'activation du système immunitaire dans l'environnement de la tumeur. Par des mécanismes encore mal compris, le système immunitaire va également s'activer dans le cerveau et détruire les neurones du cervelet. Afin d'étudier les mécanismes à l'origine de la pathologie, le recours à un modèle animal est indispensable à cause de la rareté des échantillons de patientes et permettra des analyses plus approfondies depuis l'apparition de la tumeur jusqu'à la destruction des neurones. L'objectif principal de ce protocole expérimental est donc de développer un modèle de la maladie chez la souris qui soit au plus proche de la maladie humaine.

Pour développer notre modèle, nous provoquerons le développement d'un cancer ovarien chez la souris par l'implantation de cellules tumorales dans la cavité abdominale des souris. Nous stimulerons ensuite la réponse immunitaire par une vaccination avec nos protéines d'intérêt et avec un traitement qui favorisera la réponse immunitaire dans le cerveau. La destruction des neurones du cervelet des souris sera évaluée par des tests de coordination et de motricité, et par des analyses sur coupe de cerveau. Une analyse en fin de protocole du sang, des tumeurs et du cerveau permettra d'identifier la présence d'anticorps spécifiques, et de caractériser la réponse immunitaire. Notre protocole expérimental permettra également d'étudier le rôle de nos protéines d'intérêt dans le développement de la maladie en fonction de leur représentation dans la tumeur.

La règle des 3R sera appliquée conformément à la directive Européenne : (I) Des études réalisées au laboratoire à partir du sang des patientes ont permis d'identifier les protéines ciblées dans les neurones du cervelet. Ces mêmes protéines ont été identifiées dans les tumeurs. Un modèle de la maladie chez la souris est désormais indispensable pour valider nos hypothèses sur les mécanismes qui conduisent à la destruction des neurones du cervelet. Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance (II) Dans un souci de raffinement de notre procédure expérimentale nous allons mettre en place une phase pilote d'évaluation du modèle de cancer ovarien chez la souris. Le recours à ce modèle implique une connaissance précise de l'évolution de la tumeur et de son impact sur le bien-être de nos souris pour pouvoir anticiper sur la nécessité d'un antidouleur. Une grille d'évaluation de la souffrance et de la détresse de l'animale mise en place lors de cette phase permettra d'administrer un antidouleur adapté le plus tôt possible. Nous allons placer notre procédure expérimentale pendant la phase asymptomatique du cancer ovarien pour éviter toute interférence de la progression du cancer avec l'évaluation des troubles locomoteurs. Du fait de la courte durée de la procédure (8 semaines maximum), les symptômes attendus seront faibles et n'impacteront pas de manière significative sur le bien-être animal. (III) Le projet sera découpé en plusieurs phases afin de hiérarchiser les expérimentations et réduire le nombre d'animaux. La phase pilote pour l'évaluation de la douleur et de la croissance tumorale nécessitera l'utilisation de 22 animaux. Pour la phase principale nous réaliserons à chaque étape une première série d'expérimentations sur la moitié de l'effectif prévu. Un test statistique permettra de déterminer l'effectif supplémentaire éventuellement nécessaire pour consolider les résultats. Nous compléterons alors au maximum jusqu'à l'effectif prévu initialement pour la phase principale soit au maximum 292 animaux. Les 2 phases cumulées nécessiteront donc 22+292 animaux soit 314 au total.

Nous limiterons également le nombre d'animaux au maximum en réalisant les tests de comportement et les différentes analyses sur les animaux d'un même lot.

Grâce à ce modèle de la maladie, l'identification des mécanismes qui conduisent à l'activation des défenses immunitaires contre les neurones du cervelet des patientes permettra à terme de développer une thérapie efficace pour guérir les femmes atteintes de cette maladie.

7177. La pharmacologie des récepteurs couplés aux protéines G (qui représentent 40% des cibles des médicaments actuels) est en train de connaître une évolution avec le concept récent d'agonisme « biaisé » (biased agonism), appelé également « agonisme fonctionnel ». L'agonisme fonctionnel implique que certaines molécules agonistes transmettent leurs signaux neurochimiques via certains récepteurs d'une même famille (et non pas l'ensemble des récepteurs), en fonction des sous-familles des protéines intracellulaires couplées à ces derniers. Ce concept de sélectivité fonctionnelle des ligands ouvre donc, en théorie, la possibilité de privilégier l'activation d'une voie de signalisation particulière, éventuellement dans certaines régions cérébrales, en limitant les effets indésirables inhérents à une stimulation pharmacologique classique non sélective.

Notre objectif est de contribuer à l'établissement de la preuve de concept de ces agonistes biaisés en proposant pour la première fois leur étude en imagerie *in vivo* multimodale. Pour cela, nous avons choisi d'explorer la stimulation ciblée des récepteurs sérotoninergiques 5-HT<sub>1A</sub>. Ces récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> sont associés à de nombreux processus pathologiques du système nerveux central et constituent une cible thérapeutique connaissant un regain d'intérêt en neuropharmacologie (Parkinson, Alzheimer, maladies orphelines...) et en psychopharmacologie (dépression, schizophrénie...). Ainsi, notre étude se focalisera sur deux agonistes biaisés ciblant préférentiellement différentes populations de récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, et qui sont actuellement à l'étude pour une future utilisation thérapeutique :

-Le F13640 (également connu sous le nom de befiradol ou NLX-112) pour le traitement des dyskinésies induites par la L-DOPA chez les patients atteints de la maladie de Parkinson.

-Le F15599 pour le traitement de troubles respiratoires et cognitifs dans le syndrome de Rett, une maladie génétique orpheline.

Notre protocole expérimental tirera profit de l'utilisation complémentaire de deux techniques d'imagerie, l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) et la tomographie par émission de positons (TEP). L'imagerie TEP peut être utilisée pour mesurer de manière indirecte le taux d'occupation de récepteurs par des médicaments, qui peut être corrélé avec l'effet pharmacologique. De manière complémentaire, l'IRM fonctionnelle qui permet de mesurer les variations d'oxygène transportée par l'hémoglobine en fonction de l'activité neuronale sera utilisée pour cartographier les effets de molécules à visée en centrale sur l'activité cérébrale. Le projet vise donc à évaluer chez ces agonistes biaisés leurs différences en termes de fixation aux récepteurs 5-HT<sub>1A</sub>, et à les corréler avec des profils d'activation cérébrale différents.

Une première partie du projet sera effectuée chez le rat, espèce pour laquelle les effets comportementaux et neurochimiques de ces deux molécules sont les mieux documentés, et utilisera 50 animaux au maximum pour l'étude TEP et l'étude IRM fonctionnelle. Chaque animal recevra une des deux molécules d'intérêt à 3 doses différentes afin de rentabiliser au maximum son utilisation et l'euthanasie ne sera effectuée qu'à l'issue d'une session complète d'imagerie *in vivo*, seulement si les traitements pharmacologiques répétés ne permettent plus de considérer l'animal comme « témoin » en vue de sa réutilisation ultérieure pour un autre protocole. La seconde partie du projet se déroulera chez le chat et tirera profit de la caméra hybride TEP/IRM pour explorer les deux modalités d'imagerie de manière simultanée, la résolution spatiale de cette caméra ne permettant pas de réaliser ces acquisitions sur de plus petits animaux. Quatre chats seront utilisés pour ce protocole et recevront plusieurs doses des deux molécules d'intérêt. Il n'y a pas d'euthanasie des chats dans la mesure où ces modèles précieux sont en nombre limité et sont gardés plusieurs années (environ 10 ans).

L'ensemble du projet est effectué dans la stricte application de la règle des 3R et ne comporte que des gestes peu invasifs comme la pose d'un cathéter veineux ou intrapéritonéal, et sera effectué sur des animaux anesthésiés. Les effectifs sont réduits au maximum et le raffinement est assuré aussi bien dans les conditions d'hébergement et dans le déroulement des procédures comme par exemple les chats qui seront intubés et ventilés artificiellement afin de réduire au maximum les risques liés à l'anesthésie gazeuse.

7178. Objectif du projet: Évaluer la toxicité *in vivo* de nouvelles entités chimiques, destinées à être administrées chez l'homme, après injections répétées par voie intraveineuse ou sous cutanée, chez le mini-porc et le rat. En effet, les programmes réglementaires d'évaluation de la sécurité non clinique doivent comprendre deux espèces pertinentes (rongeurs : rat ou souris et non-rongeur : mini-porc). Les espèces animales retenues sont choisies pour leur capacité à prédire le mieux possible les effets secondaires.

Avantages : Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de documenter précocement la toxicité *in vivo* du produit d'intérêt et de définir une dose sans effet indésirable reliée à un niveau d'exposition systémique. De plus, le choix de la voie intraveineuse permet de s'affranchir des éventuels problèmes de faible biodisponibilité (par rapport à la voie orale notamment). Les données ainsi obtenues contribueront à la sélection de molécules candidates et au choix des doses à utiliser plus tard chez l'homme pour les indications thérapeutiques ciblées.

Domages escomptés : En accord avec les recommandations réglementaires internationales, il est nécessaire de documenter au préalable des études cliniques la potentielle toxicité du produit chez l'animal. La sélection de points limites appropriés (eu égard à la molécule testée) et l'utilisation d'un produit analgésique (si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux) seront prévues dans ce projet.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucun test réglementaire ou méthode *in vitro* validée scientifiquement, reconnu par la législation de l'Union Européenne qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de toxicologie et de toxicocinétique adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces : Les espèces mini-porc et rat seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence des outils d'analyses *ex vivo* spécifiques de ces espèces comme par exemple les examens de laboratoire (hématologie – biochimie plasmatique et urinaire et analyse des paramètres de coagulation).

-Nombre d'animaux : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées (réponses cliniques et biologiques) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées :

Le nombre maximum de mini-porcs envisagé dans la procédure expérimentale incluse dans ce projet est de 54 animaux. Sur la base de cette procédure, pouvant être réalisée maximum 5 fois par an, un total maximum de 1350 animaux pourra être utilisé sur une période de 5 ans.

Le nombre maximum de rats envisagé dans les procédures expérimentales incluses dans ce projet (maximum 5 fois par an) est de 9400 sur une période de 5 ans.

Conditions d'hébergement et de soins :

Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées (enrichissement) ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne en vigueur.

7179. Les changements climatiques actuels se manifestent, non seulement par un accroissement global des températures moyennes, mais aussi par la recrudescence des événements climatiques extrêmes. Ces modifications du climat affectent le fonctionnement de nombreux écosystèmes et conduisent à des changements dans la distribution, les effectifs et les performances de nombreuses populations végétales et animales. Dans ce contexte, comprendre les réponses des organismes aux perturbations environnementales répond à un besoin sociétal pressant notamment pour la prévention des risques futurs d'érosion de la biodiversité.



A ce jour, l'impact des changements climatiques sur les populations naturelles est majoritairement étudié par des approches corrélatives. Or, afin de prédire la sensibilité des espèces aux changements environnementaux, il est nécessaire d'identifier les mécanismes physiologiques sous-jacents. Par ailleurs, il est nécessaire de réaliser un suivi sur plusieurs années afin de confronter des épisodes climatiques contrastés et d'établir des liens forts entre contraintes climatiques, flexibilité physiologique et dynamique des populations. L'objectif principal de notre étude est d'établir ce lien mécanistique entre conditions climatiques et performances individuelles chez un mammifère emblématique du milieu alpin : la marmotte alpine.

Chez la marmotte alpine, la survie hivernale et le succès reproducteur sont directement liés (i) à la quantité de réserves de graisses accumulées au moment de l'entrée en hibernation et (ii) aux dépenses énergétiques au cours de l'hibernation. Ce niveau de dépenses énergétique est lui-même intimement lié aux profils d'hibernation (durée totale de l'hibernation mais surtout le nombre et la durée des épisodes de réveil au cours de l'hiver). En affectant les patrons d'hibernation, des changements dans les conditions climatiques pourraient donc affecter la balance énergétique hivernale et affecter profondément la dynamique de population de marmottes. Mesurer en continu la température corporelle de marmottes dans leur environnement naturel, est aujourd'hui techniquement réalisable grâce à l'implantation intra-abdominale d'enregistreurs de température miniaturisés (logger). Au cours de cette expérimentation, nous mesurerons les profils de températures internes de marmottes pendant plusieurs années. Les résultats seront croisés avec des variables climatiques mesurées sur le site d'étude et des données démographiques. Le but ultime est de développer un modèle de distribution mécanistique qui prendra en compte les mécanismes démographiques, physiologiques et évolutifs afin de prédire l'évolution de l'aire de distribution de la marmotte alpine.

L'étude se limitera aux marmottes appartenant à 6 groupes (familles) faisant l'objet d'un suivi démographique et constitués en moyenne de 6 adultes/sub-adultes ainsi que de 4 juvéniles (4 marmottons par portée et par an en moyenne).

L'étude portera donc sur un maximum de 36 adultes et 120 juvéniles répartis sur 5 ans. Au sein d'un laboratoire de terrain, la procédure d'implantation des micro-enregistreurs de température s'effectuera sous anesthésie générale elle-même renforcée par i) une anesthésie locale au site d'implantation et ii) l'administration d'anti-inflammatoires à doses antalgiques. Les marmottes seront libérées sur le site de capture. Au bout de 3 années d'enregistrement (2 ans pour les juvéniles) les marmottes seront re-capturées et anesthésiées afin de remplacer les enregistreurs. A la fin de la cinquième année, tous les individus seront désimplantés.

7180. Les centrosomes sont des organites très complexes qui organisent le cytosquelette de microtubules dans la plupart des cellules animales et humaines. Au cours du développement des tissus, ces centrosomes subissent des changements structuraux et fonctionnels importants aboutissant à des réorganisations dramatiques du cytosquelette de microtubules.

Mutations dans plusieurs gènes codant pour des protéines du centrosome, y compris la ninéine, sont responsables des malformations du cerveau (microcéphalie) et des anomalies de croissance (« primordial dwarfism » ou nanisme primaire).

Il est supposé que les protéines de centrosome jouent aussi un rôle dans la formation de la peau. La peau est un organe multicouche (stratifié) qui constitue la barrière cutanée. Chez l'humain, la perte de l'homéostasie tissulaire et de la fonction barrière sont observées dans de nombreuses pathologies de la peau pro inflammatoires congénitales et non congénitales, mais seulement quelques gènes et mécanismes cellulaires ont été identifiés à l'origine de ces troubles.

La fonction de la barrière dépend d'une architecture tissulaire unique. Elle dépend des kératinocytes, qui après réorganisation du cytosquelette, acquièrent une forme aplatie et des nouvelles jonctions intercellulaires. Lors de la différenciation des kératinocytes, des protéines centrosomales apparaissent relocalisées aux jonctions intercellulaires, et c'est exactement ici, où des réseaux de microtubules apparaissent ancrés. La déficience d'une protéine d'organisation des microtubules, la *Lis1*, conduit à la perte de fonction de barrière, mais les effets de la déficience des autres protéines ne sont pas connus. Cependant, des résultats préliminaires en culture cellulaire suggèrent fortement que l'interférence avec la réorganisation des microtubules au cours de cette différenciation entraîne des défauts d'organisation et d'architecture des cellules.

Le projet proposé vise à identifier le rôle joué par les protéines centrosomales dans la formation du cerveau et de la barrière de la peau et nécessite l'utilisation d'un total de 1651 souris en 5 ans.

En particulier, nous allons générer, importer et maintenir des modèles de souris, utilisant 1098 souris, dans lesquelles les protéines du centrosome, y compris la ninéine, seront spécifiquement éliminées. Par la suite nous allons déterminer le rôle et l'importance fonctionnelle de l'ancrage de microtubules. En conséquence, ceci nous permettra de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires dans la formation du cerveau et de la peau et les défauts éventuels dans les anomalies développementales et dans les maladies associées (cette partie nécessite 553 souris).

Règles 3R :

Dans un premier point, afin d'obtenir des informations percutantes et précises concernant le rôle de ces protéines centrosomales *in vivo*, une analyse phénotypique de la morphogénèse par histologie et immunohistochimie sur embryons à des stades précoces, avancés et tardifs, basée sur 218 souris, est indispensable. Ici, la génération d'un modèle génétique de souris de perte de fonction reproductible avec peu de variance, permet la réduction du nombre d'études sur souris qui serait nécessaire utilisant des approches de perte fonction transitoire, non reproductibles. Le nombre des souris à analyser (6 à 10 par stage et génotype) permettra non seulement de comparer qualitativement les organes des souris mutantes avec ceux des souris sauvages aux stades successifs. Mais en plus des différences qualitatives, des quantifications des caractères mesurables (taille du cerveau, grosseur de l'épiderme, nombre de cellules progénitrices, nombre des cellules en différenciation etc.) sont envisagés et seront exploités tout en appliquant des tests de statistique puissants (test de Student, etc.). Ceci permettra d'obtenir des réponses très précises, exigées par la communauté scientifique internationale pour l'échange de données. Ainsi nous prévoyons analyser 6 à 10 individus par stade, génotype et fond génétique, et nous pourrions diminuer ce nombre en fonction de la pénétrance et de l'expressivité du phénotype étudié chez le mutant voire de la robustesse du processus développemental. Concernant la production des souris, nous allons veiller à ce que les conditions soient excellentes, standardisées et non variables (raffiner).

De surcroît, afin d'atteindre nos objectifs scientifiques et les approches étant complémentaires, nous allons remplacer un grand nombre d'expériences sur les animaux grâce au développement de modèles cellulaires déficients en protéines centrosomales, provenant des souris génétiquement modifiées. Ces travaux ne sont pas décrits dans ce projet, mais c'est dans ces modèles cellulaires que nous allons faire un maximum d'expériences, afin d'étudier toutes les conséquences de la perte de fonction de protéines centrosomales sur l'organisation cellulaire, la dynamique du cytosquelette, les jonctions cellulaires et le comportement cellulaire. Ceci nous permettra finalement de modéliser les processus impliqués.

Dans un deuxième point, afin de produire des anticorps, actuellement non disponibles mais nécessaires dans nos études et qui seront dirigés contre des protéines d'intérêt, nous allons immuniser quelques souris avec des antigènes, les tester et enfin collecter les anticorps.

Dans un dernier point, des travaux récents suggèrent qu'au cours du développement de la peau il existerait des mécanismes de compensation qui conduisent à un fonctionnement quasi normal de la barrière, malgré la présence des mutations. C'est pour cela que finalement nous devons tester sur l'individu *in vivo*, si la barrière épidermique des souris mutantes est bien fonctionnelle comme celle des souris sauvages, après contact avec un agent légèrement irritant, largement utilisé dans l'étude du modèle de dermatite irritative de contact. Dans le cas de l'immunisation ainsi qu'au cours du traitement de la peau avec l'agent, nous allons améliorer les conditions pour les souris et adopter les mesures indiquées réduisant ainsi la douleur de l'animal au minimum et dans la durée (raffiner). Ainsi les données obtenues avec les souris pourront compléter de façon scientifique rigoureuse nos études récentes basées sur les modèles des cellules.

7181. La maladie de Parkinson (MP) est liée à la dégénérescence d'un sous-groupe de neurones dopaminergiques dans le cerveau. Elle est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente avec 6 500 000 de malades dans le monde et 1 à 2 % de la population de plus de 65 ans touchés. La maladie se manifeste par une akinésie, des tremblements, une rigidité et une instabilité posturale. Cette maladie, pour laquelle il n'existe pas de traitement curatif à ce jour, est causée par l'agrégation sous forme de dépôts fibrillaires d'une protéine naturellement abondante à la jonction des neurones, l'alpha-synucléine. Ces agrégats d'alpha-synucléine mal repliés se propagent d'un neurone à l'autre. Lorsqu'ils envahissent un nouveau neurone, ils sont capables de recruter l'alpha-synucléine normale pour l'ajouter au dépôt.

L'objectif général de nos protocoles est d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la maladie de Parkinson sur un modèle de rat et de tester différents agents neuroprotecteurs afin de voir l'impact sur la propagation d'alpha-synucléine par des approches cellulaires (cultures primaires, cultures de lignées cellulaires) et intégratives (histologie, comportement, biochimie, méthodes moléculaires).

Des études ont démontré une efficacité dans des modèles pro-oxydants de la MP (modèle MPTP et 6-OHDA) mais pour apporter une valeur translationnelle à ces recherches, il est important de démontrer leur efficacité sur un modèle de protéinopathie. Le modèle de rat AAV2/9 -alpha-synucléine sera utilisé. Ce modèle reproduit la neurodégénérescence progressive de la voie nigro-striée ainsi que des déficits comportementaux *in vivo* suite à l'injection intracérébrale d'un virus adéno-associé incorporant une mutation de l'alpha-synucléine (AAV2/9 -alpha-syn). Ces expériences nécessitent une évaluation comportementale et donc l'utilisation d'un modèle animal.

Dans ce projet, 1900 rats Sprague Dawley seront nécessaires sur 5 ans.

Pour limiter l'utilisation d'animaux, l'étude de la potentielle toxicité, des mécanismes d'action et de protection seront étudiés en parallèle sur un modèle cellulaire (Remplacement). De la même façon, les animaux qui reçoivent le traitement seront aussi utilisés pour étudier l'efficacité sur les symptômes moteurs, cognitifs et pour l'étude histologique post-mortem de l'effet du traitement (Réduction). Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux sera effectué pour surveiller l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour lesquels des décisions adaptées de traitement analgésiques voire d'euthanasie seront prises (Raffinement).

7182. Les patients traités par radiothérapie pelvienne peuvent développer des séquelles digestives liées à l'irradiation des tissus non tumoraux. Le but du projet est de comprendre le rôle du compartiment vasculaire dans l'initiation et le développement des lésions radio-induites digestives, et en particulier les conséquences physiopathologiques des modifications du phénotype des cellules endothéliales irradiées.

Pour comprendre de manière intégrée et fiable ces mécanismes nous devons utiliser des modèles expérimentaux pré-cliniques *in vivo*.

La lésion tissulaire sera réalisée grâce à une irradiation localisée du rectum ou de l'intestin grêle chez le rongeur. Ces modèles *in vivo* permettent de modéliser les lésions tissulaires observables chez l'homme et sont utilisés depuis plusieurs années au laboratoire.

Les espèces choisies sont la souris et le rat, modèles de référence pour les études précliniques et qui, pour la souris, permettent par l'utilisation de lignées transgéniques de démontrer des phénomènes à l'échelle d'un organisme entier. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 652 souris et 80 rats.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale.

Les études histologiques et moléculaires se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié avant euthanasie.

7183. Les patients traités par radiothérapie thoracique peuvent développer des séquelles pulmonaires liées à l'irradiation de tissus pulmonaires non tumoraux. Le but du projet est de comprendre le rôle du compartiment vasculaire dans l'initiation et le développement des lésions radio-induites pulmonaires, et en particulier les conséquences physiopathologiques des modifications du phénotype des cellules endothéliales irradiées.

Pour comprendre de manière intégrée et fiable ces mécanismes nous devons utiliser des modèles expérimentaux précliniques *in vivo*. La lésion tissulaire sera réalisée grâce à une irradiation du thorax entier ou une irradiation stéréotaxique d'un petit volume pulmonaire (collimateur diamètre 3mm). Ces modèles *in vivo* permettent de modéliser les lésions tissulaires observables chez l'homme et sont référencés depuis plusieurs années dans la littérature en ce qui concerne le thorax entier. Le recul est moindre pour l'irradiation stéréotaxique qui sera réalisée pour la première fois au laboratoire.

L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques et qui permet par l'utilisation de lignées transgéniques de démontrer des phénomènes à l'échelle d'un organisme entier. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 280. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables.

Les études histologiques et moléculaires se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié avant euthanasie.

7184. Lors de blessure de la peau (blessures aiguës ou dues aux maladies chroniques) ou après chirurgie le besoin en cicatrisation est important. Tous les types de chirurgies sont concernées : de la chirurgie de la main par ouverture du plan cutané, à la greffe de peau suite à l'ablation de mélanome. Les blessures de la peau comprennent les blessures aiguës (brûlures, engelures, abrasions et coupures) et les blessures dues aux maladies chroniques (ulcères de jambe ou de pieds par exemple).

Le secteur des pansements est un secteur extrêmement dynamique. Cet essor s'explique notamment par le vieillissement de la population et l'accroissement des maladies chroniques affectant la bonne guérison des blessures (diabète, cancers). La prévalence des seuls ulcères de jambe est estimée à 2% de la population des pays industrialisés. De ce fait, l'amélioration du traitement des blessures est un objectif capital de santé publique.

Ce secteur est en demande d'innovation et s'appuie sur de nouveaux matériaux pour se développer. Répondre à cet enjeu de santé publique nécessite le développement de nouveaux types de pansements, que ce soit pour les soins traditionnels (bandages, pansements etc.) ou avancés (substituts dermiques et tissulaires, collagène, hydrogels biocompatibles etc.). Le pansement du futur devra être polyfonctionnel et « intelligent » en présentant des activités biologiques complémentaires pour le traitement des blessures. Il pourra par exemple posséder des propriétés anti-inflammatoires, favoriser la cicatrisation et l'élimination des tissus nécrosés, l'adhésion des cellules ou encore posséder des propriétés antimicrobiennes.

Dans cette étude, un pansement commercial a été rendu « intelligent » par la voie chimique : une activité biologique est ajoutée par greffage de peptides pro-cicatriciels à la surface.

Les peptides sont des molécules à activités biologiques fabriquées au sein du laboratoire de recherche sur les acides aminés, peptides et protéines.

De nombreuses études réalisées *in vitro* révèlent une excellente biocompatibilité de ces biomatériaux. Le pouvoir procicatriciel a été évalué *in vitro* par induction de cicatrices sur un tapis cellulaire ainsi que par évaluation de la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules au contact des matériaux (collagène 1 et 3). Les produits ont démontré un potentiel de cicatrisation intéressant *in vitro*, cependant, il est nécessaire de les tester sur un modèle animal mimant au mieux le phénomène de cicatrisation chez l'homme et dont l'organe cible, la peau, y est quasiment similaire : le modèle porcin.

Le but de cette étude est d'évaluer l'amélioration de la qualité et de la vitesse de cicatrisation de plaies par ces différents pansements chez le cochon. Ces pansements seraient indiqués pour le traitement des peaux fragiles, des peaux brûlées, des plaies aiguës, des plaies chroniques ou des plaies après chirurgie réparatrice. Nous avons choisi le modèle le moins invasif possible pour l'animal, celui d'une plaie non profonde dite de « split-thickness » comprenant sur une zone limitée l'éraflure de l'épiderme et d'une petite partie du derme. Il est nécessaire de comparer l'évolution de la cicatrisation induite par les pansements : c'est pourquoi deux porcs seront utilisés pour cette étude.

Pour cela, il sera réalisé différentes plaies superficielles calibrées sur le derme de cochons puis les "pansements bioactifs" seront placés sur les plaies. A la suite de l'implantation, nous évaluerons macroscopiquement l'aspect des plaies, la taille des plaies, l'avancement de la cicatrisation, la présence d'inflammation ou d'infection tous les jours pendant 30 jours. Afin de quantifier et imager les phénomènes de cicatrisation plus précisément, une étude histologique sera effectuée. En effet, l'étude des tissus permet de voir les différentes phases de cicatrisation et de les scorer.

Pour mettre en place cette étude, nous nous sommes entourés d'un dermatologue (MCU-PH) et d'un spécialiste de l'expérimentation animale et de l'histologie.

Ce projet a été élaboré en accord avec les 3R :

La réduction du nombre d'animaux a été réalisée de façon à obtenir le nombre suffisant de données pour répondre à la problématique.

- Nous avons réduit au maximum le nombre d'échantillons en faisant un screening poussé grâce à des études *in vitro* : ne reste pour cette étude que les échantillons sélectionnés.
- Nous avons aussi réduit les différents temps d'études et sélectionner les deux temps les plus pertinents pour l'étude de cicatrisation.
- Nous avons réduit le nombre d'animaux pour chaque échantillon afin d'avoir suffisamment de données pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

7185. Suite à la découverte de deux cas humains de brucellose en 2011 associés à la consommation de lait cru issu d'un élevage bovin laitier en France (Haute Savoie), la présence d'un réservoir sauvage de *Brucella melitensis* biovar 3 a été confirmée en 2012, dans une population de Bouquetin des Alpes (*Capra ibex*) du massif du Bargy. Cette population de bouquetins a fait l'objet d'études approfondies depuis lors, mettant en évidence une forte séroprévalence (>40%) et un important portage de la bactérie entre 2012 et 2016. La gestion de ce foyer sauvage s'est appuyée sur des abattages partiels ciblés ou non (selon le statut sérologique des animaux) qui ont conduit à éviscération par deux la taille de la population, sans permettre néanmoins de diminuer la prévalence de la maladie, ni d'assainir la population. Une expertise par l'autorité compétente consistant à analyser les données de suivi depuis 2012 sur les bouquetins du massif du Bargy et à évaluer l'efficacité relative des différents modes de lutte sanitaire a été réalisée.

Cette expertise a mis en évidence l'intérêt de la vaccination, en complément d'abattages ciblés, pour le contrôle de la brucellose dans cette population. Les experts ont recommandé l'utilisation du vaccin Rev.1 (vaccin vivant atténué) par voie conjonctivale mais ont également recommandé de vérifier l'innocuité de ce vaccin chez le bouquetin avant son utilisation sur le terrain.

Dans ce but la présente demande concerne une étude de vaccination conjonctivale chez le bouquetin des Alpes (*Capra ibex*, animaux nés et élevés en captivité) afin de caractériser la réponse immunitaire suivant la vaccination. Cette expérimentation vise à décrire la diffusion du vaccin dans les organes des deux espèces chez des individus vaccinés (8 individus) et témoins « contact » (2 individus) sexuellement matures des deux sexes (5 mâles et 5 femelles), en évitant toutefois les individus gestants. L'appréciation de la diffusion de la souche vaccinale suppose de réaliser une euthanasie séquentielle (45 et 90 jours suivants la vaccination) pour examiner la présence de la bactérie dans les organes des animaux.

Une expérimentation similaire sera également conduite en parallèle (autre établissement utilisateur) chez la chèvre domestique (*Capra hircus*). La forme vaccinale disponible ayant été autorisée chez la chèvre (AMM), ces deux études analysées conjointement devraient permettre de confirmer la proximité des réponses immunitaires des deux espèces.

Remplacement et réduction : en l'absence de méthode alternative pour mesurer l'efficacité vaccinale, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été déterminé grâce au plan d'expérience utilisé pour évaluer l'efficacité du vaccin en tenant compte de la capacité à maintenir des bouquetins semi-sauvages en environnement confiné.

Raffinement : il y aura un enrichissement social (hébergement en groupes séparés en fonction du sexe) et de structure (paillage, 2 aires de jeu séparées pour les 2 sexes).

7186. L'activité des cellules cérébrales s'accompagne d'une augmentation de consommation d'énergie. Pour apporter ce supplément d'énergie aux cellules qui en ont besoin dans une région précise du cerveau, il existe un système d'activation vasculaire basée sur une augmentation de débit sanguin cérébral (DSC) qui irrigue les neurones. Cette activité vasculaire, en souffrance dans plusieurs pathologies cérébrales ou métaboliques, est encore peu connue car elle est difficile à enregistrer dans le cerveau des modèles animaux.

Dans ce contexte, ce projet scientifique concerne la mise au point d'une technique d'imagerie optique pour enregistrer les variations de DSC dans une région précise du cerveau de souris *in vivo*. Connaissant la forte sensibilité olfactive des rongeurs, nous enregistrerons les variations de DSC dans le bulbe olfactif, la première structure qui code l'information olfactive dans le cerveau des mammifères, en réponse à la présentation d'odeurs chez la souris anesthésiée. Le principe de la technique d'imagerie repose sur le fait que les propriétés optiques du tissu qui sont enregistrées par une caméra sont perturbées par le mouvement d'objets microscopiques en mouvement (ici les globules rouges dans le sang) créant ainsi un contraste sur l'image qui est exploitable pour détecter des changements de DSC.

Pour ce projet, l'étude des souris *in vivo* est nécessaire et ne peut être remplacée par des modèles d'invertébrés qui n'ont pas de vaisseaux sanguins qui ressemblent à ceux des vertébrés. Bien que le système olfactif présente des caractéristiques communes entre les invertébrés comme les insectes et les vertébrés comme les mammifères, il n'existe pas de débit sanguin cérébral (DSC) régulé dans le système nerveux réduit des invertébrés qui soit comparable aux vertébrés. De plus, c'est par l'inhalation de molécules odorantes, pendant l'inspiration de l'air, que s'effectue l'activation sensorielle olfactive, donc les cellules olfactives en culture sont inappropriées à notre étude. La mise au point d'une technique d'imagerie optique chez la souris *in vivo*, référencée seulement par des groupes américains et que nous voulons développer en France, est donc nécessaire dans ce projet. Trente souris provenant d'un élevage agréé seront nécessaires pour mettre au point cette technique d'imagerie au laboratoire. Ce nombre correspond à l'ensemble des tests pour régler l'appareil d'imagerie afin d'avoir le meilleur signal fonctionnel possible (intensité, reproductibilité). De plus, nous reproduirons les propriétés optiques du tissu cérébral grâce à des gels *in vitro* pour calibrer notre système avant tout enregistrement chez l'animal *in vivo*, ceci afin de réduire le nombre de souris utilisées. Le raffinement (suivi du bien-être) reposera sur l'accueil des souris en animalerie en les mettant en présence d'accessoires d'enrichissement de leur milieu de vie, des objets qui seront adaptés à leur cage. Pour le protocole d'imagerie, les souris recevront des doses ajustées d'anesthésiques et d'antalgiques pour procéder aux microchirurgies nécessaires *in vivo*. Toutes les souris seront euthanasiées à la fin de l'acquisition des images.

7187. Les vaccins antirabiques à usage vétérinaire libérés sur le marché français doivent faire l'objet d'un contrôle démontrant que leur activité dépasse bien la norme internationale requise. Ce contrôle d'activité doit être réalisé selon une procédure sur souris décrite dans la Pharmacopée Européenne. La souris est une espèce très largement utilisée pour les expérimentations dans le domaine de la rage car elle présente une très bonne sensibilité à ce virus. Jusqu'alors, seule la méthode d'épreuve virale sur souris était recommandée. Ce test requiert un minimum de 120 souris pour le contrôle d'un seul vaccin. Outre le fait d'avoir recours à un nombre conséquent d'animaux, ce test génère une certaine anxiété/douleur puisque les animaux sont éprouvés avec une dose de virus rabique par voie intra-cérébrale, et peuvent développer les signes cliniques liés à la rage. Récemment, une méthode alternative à cette épreuve virale a été développée, elle permet de déterminer de façon qualitative l'activité d'un vaccin par un test sérologique (test sur sérum).

Ce test repose sur la vaccination de 2 lots de souris (1 lot vacciné par un vaccin antirabique à tester et 1 lot vacciné par un vaccin antirabique de référence) chez lesquelles on comparera les taux en anticorps antirabiques obtenus. Les avantages de cette nouvelle méthode sont multiples : 1/ réduction considérable du nombre de souris (20 souris vs 120 pour le contrôle d'un vaccin ) 2/ méthode plus rapide que le test d'épreuve (20 jours vs 28 jours) 3/ disparition de la phase "traumatisante" d'épreuve virale 4/ disparition des signes cliniques liés au développement de l'infection rabique L'application de ce test en routine pour le contrôle des vaccins antirabiques à usage vétérinaire s'inscrit parfaitement dans le principe des 3R's et dans le respect du bien-être animal. Un total de 2250 souris est prévu sur 5 ans.

7188. La consommation excessive d'alcool s'accompagne d'un large spectre d'atteintes hépatiques regroupées sous le terme de maladie alcoolique du foie. Le foie est la cible principale des effets de l'alcool et près de la moitié des décès dus à une maladie du foie en phase terminale sont imputables à l'alcool. Plus de 90% des buveurs excessifs présentent une accumulation de graisses dans le foie (stéatose) et jusqu'à un tiers d'entre eux développent une inflammation hépatique (stéatohépatite) qui peut évoluer vers la cirrhose et le cancer du foie. La pathogenèse de la maladie alcoolique du foie est complexe et reste mal connue. La prise en charge thérapeutique des patients a peu évolué au cours des 40 dernières années. Il n'existe pas à l'heure actuelle de thérapie ciblée et le traitement repose essentiellement sur l'abstinence, le support nutritionnel et les corticostéroïdes. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement et la progression de la maladie est nécessaire afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La sirtuine 6 (SIRT6) est une protéine impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme énergétique, certaines réponses au stress, l'inflammation et la tumorigenèse. Nos résultats préliminaires obtenus chez des souris invalidées pour SIRT6 dans les hépatocytes (principales cellules du foie) indiquent que SIRT6 joue un rôle critique dans les lésions hépatocellulaires induites par l'alcool et pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique.

Ce projet d'expérimentation animale a donc pour but de poursuivre la caractérisation du rôle de SIRT6 dans la maladie alcoolique du foie chez la souris. Nous étudierons le phénotype hépatique des souris invalidées pour SIRT6 dans les hépatocytes en réponse à différents modèles d'alcoolisation (chronique, aiguë, chronique plus aiguë).

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études *in vitro* sur des lignées cellulaires. Cependant, pour comprendre l'implication de SIRT6 dans le développement des maladies chroniques du foie liées à l'alcool, il nous est nécessaire de réaliser des études *in vivo* car les études *in vitro* ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types tissulaires présents dans le foie.

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un schéma de croisement qui génère 50% de souris contrôles et 50% de souris invalidées pour SIRT6 ce qui évite la génération d'animaux inutiles. Nous prévoyons d'utiliser 3520 souris sur une période de 5 ans. Chaque procédure utilise un nombre d'animaux minimum mais nécessaire pour réaliser des études statistiques pertinentes.

Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Dans les modèles d'alcoolisation chronique, le suivi pondéral des souris sera également un bon indicateur de leur état général. Il est important de préciser que les souris avec une invalidation hépatocytaire de SIRT6 ne présentent pas de phénotype dommageable. Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins 3 fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de déceler précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis pour chaque procédure.

7189. L'insuffisance cardiaque (IC) est une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Compte tenu du vieillissement de notre population et de la prévalence des maladies telles que le diabète et l'hypertension qui prédisposent les patients à ce syndrome, l'IC va augmenter dans la prochaine décennie. Les traitements actuels ralentissent sa progression néanmoins il reste un réel besoin de développer de nouvelles thérapies et donc la mise en place de modèles expérimentaux appropriés. le recours à l'animal est inévitable dans l'étude d'une maladie aussi complexe qui affecte également d'autres organes que le cœur (les reins, le système nerveux, le système hormonal). Les interactions complexes entre ces organes, qui jouent un rôle majeur dans le développement de la pathologie, ne peuvent pas être reproduites de manière adéquate avec des cellules isolées ou des simulations informatiques.

Dans ce projet, l'espèce retenue est le chien du fait des fortes similitudes de son système cardiovasculaire avec celui de l'homme. la stratégie d'étude consiste, dans un premier temps, à étudier les effets des nouveaux produits sur des cardiomyocytes isolés, ces études *in vitro* permettant d'étudier les mécanismes d'action cellulaire puis, dans un second temps, à caractériser leurs effets cardiovasculaires en utilisant la télémétrie et l'échographie puis de tester leur efficacité dans un modèle physiopathologique d'IC dont la prédictibilité a été démontrée pour des médicaments actuellement utilisés Les études réalisées au sein de notre centre de recherche sont encadrées par la présente demande d'autorisation de projet, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (l'hébergement, les soins, la manipulation, les expérimentations) et ayant toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Par exemple, l'hébergement en meute est privilégié, l'évaluation des paramètres cardiovasculaire se fait avec des moyens peu contraignants (télémétrie, échographie) et les critères d'arrêt évitent d'atteindre un stade de la pathologie trop sévère dans le modèle d'IC. Par ailleurs, chaque procédure impliquant l'utilisation d'un animal est soumise à l'approbation du Comité d'Éthique, avant toute intégration des animaux dans les études. A la demande du scientifique, un support en biostatistique est apporté par des experts de la spécialité, lors de l'élaboration du schéma expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques. Enfin, les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, à l'observation des signes cliniques fondamentaux et à la mise en œuvre des procédures expérimentales.

Etant donnée la complexité du projet, seules les molécules très avancées pourront être testées ce qui limitera le nombre d'études et nous estimons que nous allons utiliser un total maximal de 580 chiens sur la période de validation du projet (5 ans). Dans certaines procédures, les animaux peuvent être réutilisés après approbation du vétérinaire clinicien.

7190. L'évaluation et le développement des nouveaux dispositifs et techniques pour les affections cardiaques en général et des troubles de la conduction cardiaque en particulier nécessite une phase de recherche préclinique et développement qui permet de mettre au point le dispositif et vérifier leur sécurité.

La rythmologie concerne l'étude des troubles du rythme cardiaque, tels que la tachycardie (fréquence cardiaque rapide) ou la bradycardie (fréquence cardiaque lente). En matière de rythmologie, d'importants progrès ont été réalisés aussi bien en matière d'explorations électrophysiologiques qu'en matière d'électrophysiologie interventionnelle. Le défibrillateur automatique implantable (DAI), capable de détecter une tachycardie ventriculaire (TV) ou une fibrillation ventriculaire (FV) et de délivrer une stimulation et/ou un choc pour les arrêter, ainsi que le stimulateur multisite (ou triple chambre – STC), sont devenus des outils thérapeutiques incontournables avec un élargissement progressif des indications.

La fibrillation atriale (FA) est caractérisée par une fréquence cardiaque rapide et irrégulière qui limite la possibilité de l'oreillette à pomper du sang de manière efficace vers les ventricules. Une étude publiée fin 2006 avait montré qu'il existe dans la population générale une augmentation significative de l'incidence de la fibrillation auriculaire et cela indépendamment de l'âge. Les auteurs montraient que la fibrillation auriculaire va devenir une véritable épidémie, notamment aux Etats-Unis, et que, même si l'incidence de la fibrillation auriculaire cesse dorénavant d'augmenter, on peut estimer qu'entre 2008 et 2050 le nombre de patients porteurs d'une fibrillation auriculaire va probablement doubler.

L'ablation a été fréquemment décrite comme le traitement de la fibrillation atriale. L'ablation est une technique médico-chirurgicale visant à détruire la zone de myocarde arythmogène, les voies accessoires ou le tissu de conduction, à l'aide d'un cathéter d'ablation au travers duquel une source d'énergie est appliquée sur le substrat arythmogène.

La pose de pacemakers est aujourd'hui un acte parfaitement maîtrisé et codifié mais qui nécessite toujours de la recherche et du développement pour améliorer les performances électriques, augmenter l'espérance de vie des pacemakers, diminuer les risques de délogements, de fractures de sondes, d'infection, de fibrose autour des sondes, etc.

À cause des limites des médicaments, la transplantation cardiaque et les dispositifs médicaux ont été proposés pour améliorer la qualité de vie et la survie des patients en insuffisance cardiaque chronique. Récemment, la stimulation biventriculaire comme une thérapie adjuvante pour des patients en insuffisance cardiaque a été proposée comme une option viable. La stimulation biventriculaire qui implique la mise en place d'un pacemaker stimulant à gauche et à droite simultanément peut vraisemblablement fournir des nouveaux schémas de stimulation ventriculaire mieux coordonnés et de cette façon potentiellement réduire l'espace QRS aussi que la synchronie intraventriculaire est interventriculaire.

En résumé, l'enjeu médical pour l'homme de la recherche sur cette thématique des troubles de la conduction électrique dans le cœur est majeur.

La chronologie médicale inclura l'implantation et le suivi par imagerie de type échographique, angiographique, et scanner par exemple et de suivi téléométrique et clinique et examens complémentaires permettra d'assurer un cadre d'évaluation scientifique optimal mais aussi un suivi rapproché de l'évaluation de l'état de santé générale et du bien-être des animaux implantés. Des modèles de grande taille seront utilisés, avec environ 240 implantations par an sur une durée de 5 ans, sur des porcins, ovins, et plus rarement canin. Cela permettra sur 5 ans de valider les différents prototypes et réaliser les tests réglementaires de sécurité requis par les autorités. Il est donc indispensable d'avoir recours à la modélisation au préalable afin de vérifier le bon fonctionnement et la sécurité. Cela doit impérativement se faire sur des organes de taille identique aux organes de l'homme dans des conditions qui reproduisent la réalité de l'organe et de vérifier les effets secondaires néfastes sur l'ensemble de l'organisme. Les tests sur l'organisme entier sont donc incontournables. Cette phase de recherche préclinique est le filtre indispensable pour assurer la sécurité des futurs patients. Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening échographique, angiographique, IRM, scanner / reconstruction 3D afin de simuler numériquement l'adéquation du prototype. L'ensemble des tests seront réalisés sous anesthésie générale, et 3 modes d'analgésie permettront de traiter la douleur, un mode local, et deux modes généraux de médicaments anti douleurs puissants comme la morphine. Ce projet permettra donc de développer des nouvelles techniques peu invasives dans le cadre des affections cardiaques.

7191. L'évaluation et le développement des nouveaux dispositifs et techniques pour les affections cardiaques structurelles en chirurgie cardiaque et des gros vaisseaux par des méthodes de chirurgie et mini-invasives nécessite une phase de recherche préclinique et développement qui permet de mettre au point le dispositif et vérifier leur sécurité. La chirurgie cardiaque et des vaisseaux s'est développée depuis la deuxième moitié du XXème siècle, permettant de sauver des millions de personnes par an, avec l'avènement de nouvelles technologies comme la circulation extracorporelle (CEC) permettant la déviation du sang du cœur et des gros vaisseaux. Il est possible dès lors de travailler sur des cavités du cœur pendant que la machine cœur poumons assure la survie du patient durant l'intervention. Les techniques de chirurgie cardiaque s'intéressent à la réparation / remplacement de pathologies cardiovasculaire structurelles telles que par exemple les pathologies valvulaires, des cavités et parois cardiaques et des vaisseaux. La limite des techniques actuelles est leur invasivité, la nécessité de recours à la machine cœur poumons, ainsi que la durabilité des dispositifs / matériaux utilisés qui peuvent être « rejetés » par l'organisme. L'avantage escompté est une amélioration de la durabilité des implants (éviter le rejet et ainsi les ré-opérations parfois multiples des patients) et réduire le traumatisme tissulaire et éviter l'arrêt du cœur pendant la chirurgie. Les modèles animaux utilisés dans ce projet suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, et

plateau technique de bloc opératoire et d'imagerie de pointe). La chronologie médicale inclura l'implantation et le suivi par imagerie de type échographique, angiographique, et scanner par exemple et de suivi clinique et examens complémentaires permettra d'assurer un cadre d'évaluation scientifique optimal mais aussi un suivi rapproché de l'évaluation de l'état de santé générale et du bien-être des animaux implantés. Des modèles animaux de grande tailles seront utilisés, avec environ 350 implantations par an sur une durée de 5 ans, sur des porcins (n. 500), ovins (n. 1100), bovins (n. 100) et canin (n. 100). Cela permettra sur 5 ans de valider les différents prototypes et réaliser les tests réglementaires de sécurité requis par les autorités. Il est donc indispensable d'avoir recours à la modélisation au préalable afin de vérifier le bon fonctionnement et la sécurité. Cela doit impérativement se faire sur des organes de taille identique aux organes de l'homme dans des conditions qui reproduisent la réalité de l'organe et de vérifier les effets secondaires néfastes sur l'ensemble de l'organisme. Les tests sur l'organisme entier sont donc incontournables. Cette phase de recherche pré-clinique est le filtre indispensable pour assurer la sécurité des futurs patients. Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening échographique, angiographique, IRM, scanner / reconstruction 3D afin de simuler numériquement l'adéquation du prototype à l'anatomie (logiciel 3mensio) / scanner 3D logiciel 3mensio). L'ensemble des tests sera réalisé sous anesthésie générale, et 3 modes d'analgésie (locale et générales (morphiniques)) permettront de traiter la douleur. Ce projet permettra donc de développer des nouvelles techniques peu invasives dans le cadre des affections cardiaques.

7192. Le syndrome de Cohen (SC) est un syndrome rare caractérisé par l'association de nombreux déficits et malformations incluant le développement incomplet du cerveau, une obésité du tronc, des extrémités effilées, une hyperlaxité des ligaments, un retard psychomoteur, une insuffisance dans la production de certaines cellules immunitaires et une perte progressive de la vision. Le SC est secondaire à des mutations du gène VPS13B. La fonction précise de la protéine VPS13B est peu comprise à l'heure actuelle. VPS13B se localise au niveau de l'appareil de Golgi, élément de la machinerie cellulaire nécessaire à la production des protéines. A la suite de mutations dans VPS13B les cellules des patients produisent des glycoprotéines (protéines liées à des sucres) anormales. Les sucres de ces protéines ne sont plus présents en quantité suffisante. Le lien entre VPS13B, ce déficit de glycosylation et les problèmes rencontrés chez les patients reste à comprendre.

Nous souhaitons par l'étude du modèle murin, de souche C57/Bl6J inactivée pour le gène Vps13b, déterminer le rôle de la protéine dans la physiopathologie rétinienne du SC. Nous souhaitons plus particulièrement démontrer l'implication de VPS13B dans l'atrophie optique, la dégénérescence des photorécepteurs et la déficience visuelle observées chez les patients atteints du SC. Pour ce faire, nous utiliserons des techniques d'imagerie *in vivo* et d'enregistrement de l'activité des neurones de la rétine qui sont aussi utilisées chez les patients afin de comparer les données et déterminer la validité du modèle avant d'effectuer des analyses moléculaires. Les techniques d'imagerie et d'enregistrement *in-vivo* seront effectuées en collaboration avec un autre laboratoire, expert dans le domaine, en utilisant leur matériel, protocoles et assistance afin que la procédure soit réalisée dans les meilleures conditions à la fois pour le bien-être des animaux et pour la qualité des résultats obtenus. Ce projet permettra donc de mieux comprendre la rétinopathie de ce syndrome, qui est un handicap majeur chez les patients. Un challenge important est donc de trouver un traitement thérapeutique (pharmacologique ou génique) permettant de prévenir la cécité, et ainsi d'offrir aux patients une meilleure qualité de vie.

La totalité de ce projet utilisera 432 souris sur une durée de 5 ans. Des évaluations statistiques seront réalisées tout au long du projet afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Toujours dans un souci de réduction, les mêmes animaux seront utilisés pour plusieurs analyses lors de ce projet. Dans un but de raffinement, les protocoles utilisés pour les analyses à un âge donné seront, si possible, effectués sous une même anesthésie afin d'éviter un trop grand nombre de manipulation ainsi qu'un stress et une souffrance supplémentaire aux animaux étudiés. De plus, afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux, si lors d'une analyse nous observons une cécité bilatérale alors l'animal sera euthanasié avant réveil. Nous tenterons de remplacer certaines études *in vivo* par la mise en place de cultures de rétines *in vitro*, sur lesquelles nous espérons pouvoir effectuer des analyses sans avoir à travailler sur des animaux vivants. Il est prévu de faire une analyse rétrospective des souris de cette lignée après chaque année afin de pouvoir déterminer précisément le degré de sévérité de leur phénotype qui est pour l'instant estimé « modéré » du fait de la cécité qui est supposée les affecter après plusieurs mois de vie sans toutefois s'accompagner de douleurs. Ainsi, des grilles de scores seront remplies afin de mesurer la souffrance des animaux et un suivi de fertilité et de la mortalité sera effectué. Puisqu'une fois la cécité détectée nous euthanasierons les animaux aveugles nous n'avons pas classé la procédure expérimentale comme « sévère ». De plus, l'ensemble de la procédure expérimentale serait de classe « légère » si elle était effectuée sur des souris saines (techniques non-invasives).

7193. Les cellules microgliales ou macrophages résidents du cerveau sont les principales cellules présentatrices d'antigènes (CPA) de cet organe spécialisé et, de ce fait, sont des acteurs importants dans la réponse immunitaire contre les tumeurs cérébrales. En effet, s'il existe des preuves expérimentales et cliniques montrant que les lymphocytes T CD8 sont capables d'entrer dans le cerveau, leur migration, leur rétention et le maintien de leur cytotoxicité sont conditionnées par l'activation optimale et la présentation antigénique croisée des CPA locales.

Des études récentes chez la souris ont mis en évidence le rôle bénéfique de certaines bactéries intestinales dans le succès de chimio-immunothérapies anti-tumorales, notamment dans des modèles de tumeurs sous-cutanées. Cependant, très peu d'informations existent pour les autres tissus et plus particulièrement pour le cerveau. Les cellules microgliales, d'origine développementale unique, sont les premières à infiltrer la tumeur et sont anatomiquement et fonctionnellement connectés aux neurones qui sont des acteurs principaux dans l'axe bi-directionnel intestin-cerveau. De façon très intéressante, une étude très récente a montré l'impact de métabolites spécifiques microbiens sur l'activation de la microglie.

Ce projet vise à étudier la contribution du microbiote intestinal dans le succès d'une chimio-immunothérapie contre les glioblastomes. En effet, le pronostic des patients atteints de ces tumeurs, très agressives, reste toujours très sombre avec une survie à 15 mois maximum et une récurrence inévitable. La forte mortalité peut s'expliquer par un défaut de diagnostic précoce et par la faible réponse des patients au traitement actuel, exécuté suivie de radio-chimiothérapie. La recherche médicale s'oriente donc vers la combinaison de ces traitements conventionnels avec l'immunothérapie active qui permet de restimuler *in vivo* nos réponses immunitaires afin de cibler spécifiquement la tumeur sans toucher le tissu sain et d'induire une réponse mémoire contre les récurrences. Dans chaque expérience de ce projet, des souris ayant reçu un traitement antibiotique à large spectre par voie orale, diminuant drastiquement la charge bactérienne intestinale, seront comparées à des souris n'ayant reçu aucun traitement antibiotique. Nous utiliserons 360 souris C57BL/6 pour la totalité de ce projet, réalisé sur 5 ans. Ce nombre a été défini en tenant compte de la règle des 3R (Réduction du nombre des animaux avec utilisation d'un nombre minimum pour obtenir des résultats statistiquement fiables, Raffinement du protocole expérimental, pour éviter le stress de l'animal de la musique est également mise dans la pièce et Remplacement des animaux au maximum par des expériences *in vitro* préalables: test d'activation microgliale par des candidats microbiens). Nous attacherons une importance particulière à obtenir le maximum d'informations scientifiques avec chaque animal inclus dans le projet.

Tout au long de ces expériences, l'absence de douleur ainsi que le bien-être des animaux seront au centre des préoccupations par l'administration d'analgésiques au moment de l'implantation de la tumeur, du traitement chimiothérapeutique, et par une surveillance post-opératoire quotidienne des animaux. Pour éviter toute souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis seront évalués quotidiennement et constitueront les points limites de l'expérience.

7194. En France, les cancers des voies aéro-digestives supérieures (bouche, gorge, nez, face) constituent 12% des cancers. Selon la localisation et la taille de la tumeur, le traitement repose sur la chirurgie puis la radiothérapie complétée ou non par de la chimiothérapie. Malgré les progrès techniques, les séquelles esthétiques et fonctionnelles sont lourdes et surviennent chez des patients guéris du cancer.

L'ostéoradionécrose est une complication provoquée par la radiothérapie de la sphère orale. Elle se traduit par la mise à nue d'une partie plus ou moins étendue de l'os de la mâchoire qui ne guérit pas spontanément. Le traitement de l'ostéoradionécrose est médicamenteux au stade précoce, par l'association de plusieurs molécules. Dans les formes évoluées, elle nécessite l'ablation de la portion d'os nécrosée qui est remplacée par un morceau d'os prélevé dans la jambe. Cette technique de reconstruction osseuse expose le patient à une anesthésie générale prolongée, des risques hémorragiques, infectieux et des séquelles sur la jambe donneuse.

Depuis quelques années, le développement de biomatériaux a ouvert de nouvelles perspectives pour la reconstruction osseuse. Ces biomatériaux ont été largement étudiés et sont utilisés en pratique courante pour la régénération osseuse chez des patients sains. Après une radiothérapie, leurs propriétés sont moins connues. Plusieurs équipes ont déjà mis en évidence une constitution d'os, au sein de perte de substances osseuses comblées par des biomatériaux

Le modèle animal développé était celui des membres postérieurs chez le rat. L'émergence d'appareils d'irradiation plus perfectionnés va permettre d'administrer des rayons ciblés sur une mâchoire de rat sans lésion cérébrale ou des voies optiques.

L'objectif du projet est de faire évoluer le modèle de séquelles de radiothérapie sur l'os des membres postérieurs de rat vers un modèle réalisé sur la mâchoire, plus pertinent pour les ORL spécialisés dans le traitement des cancers et de leurs séquelles. Il s'agira donc de déterminer la dose d'irradiation et la taille du défaut osseux nécessaire à la réalisation d'un défaut osseux "critique" c'est à dire ne guérissant pas spontanément. Enfin, ce modèle permettra de tester de nouveaux biomatériaux et d'étudier leur comportement en territoire irradié.

Cette étude sera réalisée sur des rats consanguins de souche Lewis 1A. 30 rats seront nécessaires à la manipulation. Ils seront répartis en 3 groupes de 10, selon la dose d'irradiation reçue (0, 50 ou 80 grays). Pour chaque groupe, 4 types de défauts osseux seront réalisés (0, 1, 3 ou 5mm).

Nous avons tenu compte des 3R dans l'élaboration du projet. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires, le défaut osseux sera réalisé sur chaque hémimandibule de rat soit 2 par animal. Afin, de raffiner la méthodologie, nous avons élaboré des points limites précis dans l'objectif d'éliminer toute forme de souffrance animale. Chaque étape de l'étude sera mise en place en tenant compte du bien-être de l'animal, de son arrivée dans l'animalerie spécialisée à son euthanasie pour analyses à la fin de l'étude. Enfin, il s'agit d'une étude animale dans l'objectif de développer un modèle de pathologie humaine (ostéoradionécrose). Il n'existe malheureusement pas de solution de remplacement complet ou par des invertébrés en raison de l'étude menée sur le tissu osseux.

7195. Dans le cadre d'une collaboration, nous proposons dans ce projet d'étudier la bio-distribution de liposomes radiomarqués à l'Indium 111 sur un modèle de rats.

Dans l'industrie électro-nucléaire, un risque de contamination interne des travailleurs est associé à la manipulation de radionucléides de type actinide.

Depuis de nombreuses années, un laboratoire de RadioToxicologie étudie la radiotoxicité de ces éléments, essentiellement chez le rat et les moyens de les décorporer, c'est à dire les éliminer.

Pour cela, il faut des ligands puissants de l'uranium et du plutonium en milieu physiologique.

Notre équipe travaille depuis des années sur la production de vecteurs qui sont des liposomes et qui présentent un intérêt à être testés pour cette utilisation.

Nous fabriquons ces liposomes et les marquons.



Les expérimentations menées par ce laboratoire ont été réalisées avec des liposomes « froids » capables d'aller décorporer des radiométaux (plutonium et américium) chez des rats préalablement contaminés.

Notre participation va consister à réaliser des biodistributions de référence de ces mêmes formulations liposomales pour comprendre le mécanisme d'action des liposomes radiomarqués à l'Indium 111 chez des rats non contaminés.

Nos collaborateurs n'ont pas l'autorisation d'utiliser l'Indium-111.

Ce projet consistera à étudier la distribution des liposomes dans un organisme vivant dans les mêmes conditions que les études réalisées auparavant par ce laboratoire.

Pour cela nous aurons besoin de 40 rats.

36 = 6 groupes de 6 rats seront constitués qui seront injectés avec les liposomes radioactifs.

A ces 36 rats viendront s'ajouter 4 rats pour se familiariser au geste technique de l'injection intratrachéale.

Au total donc 40 rats.

- groupes 1 et 2 : injection d'une suspension de liposomes furtifs radiomarqués à l'In111 par voie intraveineuse dans la veine caudale. Injection unique d'un volume de 0,3 à 0,6ml (dose adaptée au poids : 1,3ml/Kg)

- groupes 3 et 4 : injection d'une suspension de liposomes conventionnels radiomarqués à l'In111 par voie intraveineuse dans la veine caudale.

Injection unique d'un volume de 0,3 à 0,6ml (dose adaptée au poids : 1,3ml/Kg)

- groupes 5 et 6 : administration d'une suspension de liposomes furtifs radiomarqués à l'In111 en intratrachéale.

Injection unique de 0,250 ml.

L'injection se fera par sonde de gavage faiblement courbée à embout "olive". Le rat est accroché par ses incisives, le ventre vers l'expérimentateur, la sonde de gavage doit être orientée vers l'avant au niveau du carrefour aéro-digestif pour rejoindre la trachée.

Avant ces injections, les rats seront anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Ketalar® / Rompun® kg 0,1mL/100G.

Ces rats seront pesés et recevront donc le volume d'anesthésique correspondant précisément à leur poids.

L'hébergement se fera par cage de deux rats, enrichie.

Deux temps pour les bio-distributions ont été choisis : 2 h et 24h

- groupes 1, 3 et 5 : euthanasie 2h après l'injection de liposomes radiomarqués

- groupes 2, 4 et 6 : euthanasie 24h après l'injection de liposomes radiomarqués

L'euthanasie se fera par une injection intrapéritonéale d'une forte dose de pentobarbital puis une section de l'aorte abdominale.

Des prélèvements du sang et des différents organes seront faits *post mortem* : foie, rate, reins, cœur, poumons, cerveau, muscles, intestins, estomac, peau, os, queue.

Ces prélèvements seront pesés et comptés dans un compteur gamma.

Règle des 3R :

- Réduire le nombre d'animaux utilisés en utilisant un nombre de rats suffisant de 6 par groupe.

Les résultats seront exprimés en pourcentage de la dose injectée par gramme d'organe et un calcul du rapport tumeur/organe sera fait.

Les moyennes et écarts type seront calculés pour 6 rats/ temps.

Les comparaisons entre les groupes seront réalisées grâce au logiciel Prism.

Le nombre d'animaux nécessaires pour ces études prend en compte cette règle.

- Raffiner en assurant une surveillance par l'expérimentateur pendant les 24 heures que dure l'expérience et en appliquant des points limite si nécessaire.

- Remplacer : il est impossible pour ces études de remplacer l'animal puisque nous avons besoin d'un organisme vivant intégré.

7196. L'obésité s'accompagne d'un large spectre de complications hépatiques regroupées sous le terme de maladie du foie gras non alcoolique. Plus de 90% des patients obèses présentent une accumulation de graisses dans le foie (stéatose) et jusqu'à un tiers d'entre eux développent une inflammation hépatique (stéatohépatite) qui peut évoluer vers la cirrhose et le cancer du foie. Malgré l'importance clinique de ces maladies chroniques du foie, aucun traitement pharmacologique efficace n'est actuellement disponible et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans leur développement et leur progression est nécessaire afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La sirtuine 6 (SIRT6) est une protéine impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme énergétique, certaines réponses au stress, l'inflammation et la tumorigenèse. Nos résultats préliminaires obtenus chez des souris invalidées pour SIRT6 dans les hépatocytes (principales cellules du foie) et rendues obèses par un régime riche en graisses indiquent que SIRT6 joue un rôle critique dans le développement de la stéatohépatite et sa progression vers la fibrose et le cancer du foie.

SIRT6 pourrait donc représenter une nouvelle cible thérapeutique dans les complications hépatiques de l'obésité.

Ce projet d'expérimentation animale a donc pour but de poursuivre la caractérisation du rôle de SIRT6 dans la maladie du foie gras non alcoolique chez la souris. Nous étudierons les phénotypes métabolique et hépatique des souris invalidées pour SIRT6 dans les hépatocytes en réponse à différents modèles nutritionnels (régimes riche en graisses ou déficient en méthionine et choline) et en réponse à un carcinogène chimique (diéthylnitrosamine).

Pour satisfaire au remplacement, nous réaliserons des études *in vitro* sur des lignées cellulaires. Cependant, pour comprendre l'implication de SIRT6 dans le développement des maladies chroniques du foie liées à l'obésité, il nous est nécessaire de réaliser des études *in vivo* car les études *in vitro* ne permettent pas de reproduire les interactions complexes qui existent entre les différents organes et entre les différents types tissulaires présents dans le foie.

Pour satisfaire à la réduction, nous utiliserons un schéma de croisement qui génère 50% de souris contrôles et 50% de souris invalidées pour SIRT6 ce qui évite la génération d'animaux inutiles. Nous prévoyons d'utiliser 1600 souris sur une période de 5 ans. Chaque procédure utilise un nombre d'animaux minimum mais nécessaire pour réaliser des études statistiques pertinentes. Pour satisfaire au raffinement, nous serons particulièrement attentifs à tout changement physique ou de comportement. Dans les différents modèles nutritionnels utilisés, le suivi pondéral des souris sera également un bon indicateur de leur état général. Il est important de préciser que les souris avec une invalidation hépatocytaire de SIRT6 ne présentent pas de phénotype dommageable. Le suivi sanitaire quotidien assuré par les animaliers auquel s'ajoutent les visites régulières des expérimentateurs (au moins une fois par semaine en fonction des procédures) nous permettra de détecter précocement tout signe de stress ou de douleur et d'appliquer les points limites que nous avons définis pour chaque procédure.

7197. La transplantation de cellules mammaires est une méthode standard pour identifier le rôle de gènes dans le développement du tissu sécréteur mammaire et pour étudier les cellules souches mammaires chez la souris. Cependant la transplantation de tissu hétérologue (bovin/murin) est très peu utilisée et constitue un modèle expérimental très original pour caractériser les populations cellulaires mammaires bovines d'un point de vue fonctionnel. Un de nos objectifs consiste à optimiser cette technique de greffe hétérologue. Pour cela, les cellules mammaires bovines seront transplantées dans des souris immunodéficientes. Cette approche de transplantation intra-espèce (souris-souris) est très bien maîtrisée et, contrairement à des études fonctionnelles *in vitro*, elle permet de conserver le microenvironnement local. Dans ce protocole expérimental, nous proposons de mettre au point cette technique en transplantant des cellules souches bovines dans des souris.

L'évaluation de la capacité des cellules mammaires à coloniser un tissu mammaire est réalisée en transplantant les cellules à étudier dans une glande mammaire de souris Nude dépourvue de ces cellules épithéliales mammaires. Les souris Nude présentent la caractéristique d'être immunodéficientes, ce qui permet d'éviter le rejet des cellules greffées. Dans un 1er temps, des tests seront réalisés en transplantant (i) des explants de biopsies mammaires bovines et (ii) des lignées cellulaires épithéliales mammaires bovines en présence ou non de fibroblastes bovins. Dans un 2nd temps, les cellules souches mammaires bovines seront transplantées en présence ou non de fibroblastes selon le protocole défini lors des tests préliminaires. Dans toutes ces expériences, le développement mammaire sera analysé. Au final, nous utiliserons 30 souris pour l'ensemble de ces expérimentations. Nous transplanterons les cellules dans les deux glandes mammaires inguinales (à gauche et à droite), ceci permet de diviser par deux le nombre d'animaux utilisé. Lors des opérations, les animaux seront anesthésiés après avoir reçu un antalgique qui agira pendant et après l'opération. Après l'opération, le bien-être des animaux sera évalué grâce à une grille de notation de la douleur. Si les animaux présentent des signes de douleur, des injections d'antalgiques seront réalisées. Si la douleur persiste les animaux seront euthanasiés. Tous les animaux utilisés pour cette expérimentation proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Aucune alternative à nos procédures expérimentales, tel que l'utilisation de culture cellulaire, n'est possible puisque nous étudions la transformation de cellules dans un organe complexe composé de plusieurs types cellulaires. Le nombre d'individus a été réduit au maximum tout en générant un nombre de données suffisantes permettant des analyses statistiques fiables. Dans un souci de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs par cage, afin d'éviter le stress dû à l'isolement.

7198. Notre objectif est de développer de peptides pour interférer avec les interactions entre CDK4 et les cyclines D (foldamères) dans les cancers pulmonaires. Nous avons déjà testé et validé ces molécules dans plusieurs modèles cellulaires *in vitro* et choisi le meilleur candidat. Nous étudierons sa bio-distribution et sa pharmacocinétique sanguine après administration par voie aérienne, intraveineuse ou intrapéritonéale dans des souris avec des xénogreffes sous-cutanées et orthotopiques de cellules tumorales pulmonaires humaines (3 groupes). Puis nous étudierons son efficacité thérapeutique par comparaison à une molécule de référence (2 concentrations) (5 groupes), puis en combinaison avec la molécule de référence (2 groupes), avec le mode d'administration choisi précédemment, sur la régression des tumeurs.

Nous utiliserons 125 animaux, conformément à la règle des 3R :

Remplacer : Les tests *in vitro* ont permis de réduire le nombre de composés à tester. Les paramètres de bio-distribution sont obtenus uniquement par l'emploi d'animaux. Cette étude préclinique est nécessaire avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Réduire : L'approche statistique et notre expérience nous permettent de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. Les cellules tumorales seront implantées en sous-cutané (sur 11 animaux pour obtenir 10 animaux avec une tumeur) ou dans les poumons (sur 4 animaux pour obtenir 3 animaux avec une tumeur). Les souris sans prise tumorale seront utilisées dans un autre protocole. Toutes les souris avec une tumeur seront utilisées et le lot suivant diminué d'autant. 6 animaux (bio-distribution) par condition permettent une analyse fiable prenant en compte les variabilités inter-individu. 8 souris seront donc implantées pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 6 souris, et 14 souris pour fournir des tumeurs sous-cutanées chez 12 souris. 3 animaux sains par condition serviront pour l'étude de la pharmacocinétique sanguine (soit 9 souris).

10 souris par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable de l'effet anti-tumoral. Dans le cas d'une administration par voie aérienne, 94 souris seront implantées pour fournir des tumeurs orthotopiques chez 70 souris. Sinon des tumeurs sous-cutanées seront implantées et le nombre de souris réduit (77 souris implantées pour fournir 70 souris avec une tumeur sous-cutanée).

Raffiner : Nous utiliserons des souris Nude, qui représentent le modèle le plus proche de la physiopathologie humaine, permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes, enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. La croissance des tumeurs pulmonaires n'entraîne pas de gêne respiratoire et sera suivie par imagerie de bioluminescence. Le niveau de sévérité de ces expérimentations est modéré. L'application de critères

d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

7199. La cachexie cancéreuse correspondant à un état d'amaigrissement et une perte de masse musculaire qui contribue significativement à la morbidité et mortalité dans la pathologie cancéreuse. Les origines peuvent être multiples comme la sécrétions de molécules par la tumeur elle-même, l'anorexie, ou encore le traitement de chimiothérapie. Plusieurs études ont montré que le traitement en lui-même pouvait induire perte de masse musculaire et entraîner une fatigue, mais la connaissance des mécanismes n'est pas encore très claire. L'implication de molécules inflammatoires tel que les cytokines ou encore les glucocorticoïdes apparaît comme évident dans d'autres pathologies à fond inflammatoire comme le sepsis. Nous voulons ici caractériser les effets de quatre traitements de chimiothérapies, actuellement utilisés dans la lutte contre les cancers gastriques, et regarder leurs effets sur la perte de masse et fonction musculaire. De plus l'effet d'un myorelaxant (Dantrolène) sera utilisé pour voir s'il peut avoir un effet préventif et protecteur sur le muscle avec une administration sur 2 jours ou 7 jours. En effet, cet inhibiteur de canaux calciques s'est montré très efficace pour ses propriétés anti-inflammatoires dans le modèle d'inflammation systémique septique, en contrant les troubles de concentrations calciques dans le muscle induit par l'inflammation. 10 groupes seront donc réalisés : 2 pour les contrôles (n=20), 3 témoins négatifs recevant le Dantrolène (n=30), les 2 recevant la chimiothérapie (n=20), et 3 avec la chimiothérapie et Dantrolène (n=30), soit au total 100 rats.

Nous travaillons dans le souci de la règle est 3R.

Réduction : ce nombre a été calculé de façon à permettre une validation statistique des résultats expérimentaux, tout en tenant compte des exigences de réduction (ni trop d'animaux, ni trop peu).

Remplacement : l'utilisation d'un modèle animal est inévitable car nous travaillons sur des mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme en entier.

Raffinement : tout au long du protocole les conditions de stabulation seront réalisées dans un souci de bien-être de l'animal. Toutes les procédures expérimentales sont réalisées par des personnes formées et habituées à travailler avec des animaux de laboratoires. De plus, les prélèvements de tissus et sang seront maximisés lors de l'euthanasie. Des points limites seront appliqués si nécessaire. L'intérêt de ce projet et de chercher des thérapeutiques visant à améliorer le traitement des patients atteints de cancer.

7200. Le méningocoque est une bactérie pathogène de l'homme responsable de septicémies et de méningites. Ces infections sont graves et malgré les traitements disponibles elles restent mortelles ou conduisent souvent à des séquelles. L'étude de ces infections est rendue difficile par la spécificité de cette bactérie pour l'homme. Afin de mimer au plus près l'infection, des souris immuno-déficientes sont greffées avec de la peau humaine et ces souris sont infectées avec le méningocoque. Ce modèle d'infection reproduit les caractéristiques tissulaires de cette infection et permet d'étudier les mécanismes impliqués, d'améliorer les traitements existant et de développer des stratégies préventives. La progression pathologique se produisant uniquement dans la petite section de peau greffée sur le dos de l'animal la sévérité de l'infection est réduite car très localisée et superficielle.

Ces travaux font suite et sont accompagnées par des expériences *in vitro* utilisant des cellules en culture. Nous avons recours aux animaux seulement lorsqu'aucune alternative n'est possible. L'impact de l'infection sur la biologie des vaisseaux, leur intégrité, la coagulation et l'inflammation ne peuvent pas être étudiés *in vitro*. Les expériences sont conçues pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés Sur la période de 5 ans nécessaire pour ce projet un total de 600 souris seront utilisées. Par ailleurs, les conditions d'élevage avant, pendant et après opération et infection sont optimisées pour maximiser le bien-être des animaux (environnement enrichi, anesthésie, analgésie pré- et post-opératoire). Trois types de procédures seront utilisés impliquant des niveaux de sévérité de classe légère.

7201. La dépression est un problème de santé publique majeur. Elle est l'origine de la majorité des cas de suicide. Si les antidépresseurs actuels sont efficaces, ils demeurent encore imparfaits. Notamment, un délai d'action de plusieurs semaines est nécessaire pour obtenir un effet de ces traitements. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc une priorité.

Récemment, il a été suggéré que le délai d'action des antidépresseurs pouvait être lié à un phénomène physiologique particulier : la neurogenèse hippocampique chez l'adulte. Ce phénomène consiste en la production de nouveaux neurones fonctionnels à partir de cellules souches. Nous étudierons en particulier ce phénomène dans un modèle murin que nous avons récemment développé : le modèle CORT qui repose sur l'élévation des concentrations en glucocorticoïdes. Les animaux ainsi traités présentent un comportement de type anxio-dépressif. De plus, dans ce modèle, nous avons identifié les protéines  $\beta$ -arrestines qui semblent être des acteurs majeurs à la fois de la réponse aux antidépresseurs et de la régulation de la neurogenèse.

Dans ce contexte, nous chercherons à comprendre les mécanismes qui lient la neurogenèse hippocampique à la réponse aux antidépresseurs.

Dans un premier temps, nous chercherons à établir quelle est l'étape cruciale de la neurogenèse impliquée de la réponse aux antidépresseurs.

Dans un second temps nous évaluerons l'implication des protéines Beta arrestines dans la relation qui lie l'effet d'antidépresseurs à la neurogenèse.

Dans notre modèle murin d'anxiété dépression, ces deux objectifs seront approchés respectivement grâce à l'abolition génétique de la neurogenèse et à la suppression de l'expression des  $\beta$ -arrestines spécifiquement dans les cellules souches hippocampique. Ces deux approches seront effectuées de manière contrôlée dans le temps.

Pour l'ensemble de ce projet, 2000 souris seront utilisées, en accord avec une analyse de puissance et en prenant en compte la règle des 3R. Remplacement : dans l'état actuel des connaissances, l'animal, dans son entité, est la seule alternative à l'étude des troubles de l'humeur. Réduction : le nombre d'animaux nécessaire a été évalué par une analyse de puissance qui permet d'attribuer le nombre d'animaux minimum dans chaque groupe pour s'assurer d'obtenir des résultats scientifiques exploitables. Raffinement : des anesthésiques seront utilisés dès que nécessaire de manière à ce que les animaux soient dans conditions optimales. Ce projet permettra non seulement de mieux comprendre les mécanismes d'action des antidépresseurs, mais aussi de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la dépression, en particulier au sein de la cascade des  $\beta$ -arrestines.

7202. Objectif du projet : évaluer les effets biologiques de produits injectables après injection dans la peau du rat ou du mini-porc. La dénomination de « produits injectables » comprend par exemple des gels d'acide hyaluronique, les injectables sont susceptibles de contenir un additif pharmacologiquement actif (exemple lidocaïne).

Avantages : Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent d'évaluer les propriétés biostimulatrices des produits injectables *in vivo* et ce sur des périodes longues (jusqu'à 24 mois chez le rongeur et jusqu'à 12 mois chez le mini-porc). Les effets biologiques associés à l'injection de produits injectables sont localisés et restreints aux cellules de la peau. Les données obtenues contribueront à la sélection de candidats à utiliser chez l'Homme dans le cadre d'indications correctrices comme par exemple la diminution des effets adverses associés à l'injection de produits de comblement (douleur, inflammation, hématome), le traitement de l'aspect de cicatrices associées à certaines pathologies (type acné sévère), ou encore la reconstruction de la face (par exemple chez les patients lipodystrophiques).

Dommages escomptés : Des stimuli mécaniques (injection à proximité d'un vaisseau sanguin du derme profond pour créer un hématome) et chimiques (traitement topique par des composés vasodilatateurs pour faciliter l'apparition d'un hématome) sont susceptibles d'être utilisés. D'autre part, des réactions cutanées (érythème, œdème, démangeaisons, douleur...) sont susceptibles d'apparaître suite à l'injection de certains produits injectables. Ces inconforts pour l'animal seront maîtrisés par le choix des doses du stimulus utilisé, par le respect d'un volume maximum injecté par site et par animal, d'un nombre limité de sites d'injection par animal, par la région corporelle sélectionnée et par le recours à un produit analgésique si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux. Les différents produits sont injectés une seule fois au jour 1 de l'étude et le suivi post-injection comprend des observations cliniques, des pesées, des mesures non invasives (photos, mesure de perfusion sanguine, colorimétrie) et des prélèvements de peau.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ni aucun test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions complexes de la tolérance des produits injectables et des réponses biologiques de la peau adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux ; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

Choix des espèces :

1) le rat Hairless (âgé de 8 à 12 semaines au jour 1 de l'étude) est utilisé en raison de la quasi absence de poil (ce qui évite la tonte pour l'évaluation des effets macroscopiques). Le modèle rat permet l'injection de plusieurs sites par animal (dans la limite du confort de l'animal) permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés par étude sans compromettre l'intégrité des résultats. Seuls les objectifs qui ne pourront pas être adressés chez le rat feront l'objet d'une étude chez le mini-porc.

2) le modèle mini-porc (âgé de 3 à 12 mois au jour 1 de l'étude) est utilisé en raison de la similarité de morphologie entre sa peau et celle de la peau humaine en particulier en ce qui concerne l'épaisseur du derme.

Une abondance d'outils d'analyses est disponible dans ces espèces pour la quantification des protéines ou pour l'analyse de l'expression des gènes.

Nombre d'animaux : il a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Compte-tenu des variations inter-individuelles et intra-individuelles anticipées, un minimum de 3 sites injectés par produit sera réalisé par étude pour permettre l'interprétation des données et l'analyse statistique des résultats générés (pour chaque procédure expérimentale, le nombre optimum d'animaux par groupe expérimental sera défini par une approche statistique adaptée). Un maximum de 100 mini-porcs sera utilisé sur une période de 5 ans (maximum 20 par an). Un maximum de 900 rats Hairless sera utilisé sur 5 ans (maximum 180 rats par an) avec 60 rats maximum par étude.

Conditions d'hébergement et de soins: Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées (enrichissement) ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations françaises et européennes en vigueur.

7203. Du fait de l'incapacité du système nerveux central (SNC) à s'auto-réparer, les traumatismes du SNC sont dévastateurs. La transplantation neuronale a été explorée comme une approche potentielle permettant de rétablir les fonctions cérébrales en remplaçant les neurones perdus par de nouveaux neurones. Nous avons préalablement démontré que des neurones transplantés issus de cellules fœtales murines pouvaient efficacement rétablir des connexions spécifiques après une lésion corticale indiquant que la réparation cellulaire du cortex et des projections corticales était possible chez la souris. L'objectif de ce projet est d'analyser l'influence d'un délai de 7 jours, entre la lésion et la greffe de cellules, dans l'évolution temporelle du greffon et de sa vascularisation. En effet, de précédentes études ont suggéré que l'introduction d'un délai entre la lésion et la transplantation, favorise la survie et la croissance du transplant. D'autre part, dans une optique thérapeutique, une greffe réalisée immédiatement après une lésion corticale n'est pas envisageable chez l'Homme. Les lésions seront effectuées au niveau du cortex moteur, soit par aspiration (efficace et permettant une abolition immédiate des neurones), soit avec un appareil de lésion cérébrale traumatique TBI (se rapprochant d'avantage des traumatismes crâniens chez l'Homme). Enfin, nous voudrions comparer et tester l'efficacité d'une source alternative de

cellules : les cellules souches humaines maintenues en culture et différenciées en précurseurs neuronaux. L'intérêt thérapeutique de ces cellules est leur capacité à se multiplier à l'infini *in vitro* et d'éliminer tous les risques de rejets chez les patients.

Notre protocole nécessite la formation de 4 groupes de souris composés chacun de 10 animaux (contrôles, souris lésées transplantées ou non, avec ou sans délai entre la lésion et la greffe). Afin de réaliser une étude chronologique des différents paramètres (inflammation, vascularisation, croissance du greffon...), ces groupes seront répétés pour étudier l'évolution de la greffe à différents temps : J0, J2, J4, J7, J14, J30 et J45. Ce protocole devra être répété 4 fois pour pouvoir réaliser la lésion corticale avec deux modèles expérimentaux différents mais complémentaires, et pour réaliser les greffes avec les deux différentes sources de cellules (embryonnaires ou cultivées *in vitro*). Cela représente un nombre total de 1120 animaux utilisés dans ce projet. La règle des 3R a été prise en considération. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

7204. La protéine Tau est impliquée dans de nombreuses maladies neurodégénératives, la plus connue étant la maladie d'Alzheimer. Il n'existe pas de traitement réparateur pour ces pathologies.

Dans ces maladies, la protéine s'agrège anormalement et induit la mort des cellules du cerveau, les neurones. Les patients souffrent de problèmes de mémoire. Notre laboratoire a déjà effectué une étude pilote, démontrant que l'injection intracérébrale de la protéine Tau, induit des déficits de mémoire chez la souris, ainsi que des changements au niveau de certaines protéines du cerveau, ressemblant à ceux mis en évidence chez les patients atteints de cette pathologie.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires) dans ce modèle de pathologie humaine. L'étude des effets de composés sur la mémoire n'est possible que sur l'animal vivant et le remplacement par d'autres méthodes n'est pas possible.

Afin d'optimiser l'efficacité des criblages de molécules, de réduire les risques d'échec des expérimentations chez l'animal et de diminuer le nombre d'animaux impliqués dans les études précliniques (réduction), les candidats médicaments potentiels auront été évalués préalablement sur des cultures de cellules nerveuses. - Seuls les composés ayant montré une efficacité neuroprotectrice *in vitro* sont alors testés *in vivo* (ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux impliqués dans les tests *in vivo*, si les tests *in vitro* mentionnés ci-dessus n'étaient pas effectués). Cependant avant d'effectuer l'étude d'efficacité, nous nous assurerons que les doses du candidat médicament n'induisent pas d'effets indésirables, rendant alors impossible l'étude d'efficacité, en testant la plus forte dose du candidat médicament sur trois animaux afin d'évaluer les effets indésirables potentiels. Si un des animaux montre un effet indésirable, alors l'étude d'efficacité ne sera pas effectuée. Les phases précoces de cette pathologie sont modélisées chez la souris (C57Bl/6J, lignée de souris, classiquement utilisée en neurobiologie, grâce à une injection intracérébrale, effectuée dans des conditions aseptiques, sous anesthésie générale et par du personnel compétent, unique de protéine Tau. Les animaux sont traités par des anti-inflammatoires ayant aussi des propriétés analgésiques avant et après la chirurgie afin de minimiser la douleur (raffinement). Ainsi, après leur réveil, suivant la chirurgie, les animaux ne sont pas dissociables d'une souris normale, n'ayant pas subi de chirurgie (raffinement), ce qui est nécessaire pour tester leur mémoire car un animal souffrant ou stressé ne pourrait effectuer ces tests. Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal, où qu'une inflammation due à la l'injection intracérébrale, ou au composé soit notée, l'animal sera euthanasié immédiatement. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude selon une méthode réglementaire.

Nous évaluerons les animaux deux fois dans deux tests de mémoire :

Test de mémoire topographique : Ce test utilise une boîte expérimentale comprenant deux compartiments de forme et d'aspect modulables par addition d'inserts. Les deux compartiments sont connectés par un couloir. Le principe du test est le suivant : L'animal est placé pendant 5 minutes dans la boîte, mais seulement un compartiment est accessible (phase d'acquisition). L'animal est ensuite replacé dans sa cage. Après 30 minutes, l'animal est replacé dans la boîte (phase de restitution) alors que les deux compartiments sont accessibles. Si l'animal se rappelle du compartiment visité lors de la phase d'acquisition, il explorera le nouveau compartiment. Le temps passé par l'animal en exploration active dans chaque compartiment est mesuré afin d'établir une mesure de la mémoire topographique. Pour le test de reconnaissance d'objets le principe est similaire au test précédent sauf que l'animal est d'abord mis en présence de deux objets identiques pendant la phase d'acquisition, puis un des objets est remplacé avec un nouvel objet, non vu auparavant, lors de la phase de restitution. Ces deux tests évaluent deux types de mémoire bien distincts et modulés par deux zones distinctes du cerveau. Les animaux seront soumis au test de la mémoire topographique à J+15 et J+30 après l'injection intracérébrale, et au test de reconnaissance d'objet à J+17 et J+32.

Ce projet de cinq ans, nécessite 3900 souris au total pour le test de 50 candidats médicaments. Les animaux seront hébergés dans des cages collectives, sauf pendant la phase de récupération de la chirurgie (24h) ou ils seront isolés (puis remis en cage groupée). Dans les deux cas, les cages contiennent du matériel de nidification et de l'enrichissement environnemental (raffinement).

7205. Environ 10% des décès dans le monde sont d'origine traumatique et 30 à 40% d'entre eux sont liés à une hémorragie. L'état de choc hémorragique est caractérisé par une hypoxie tissulaire systémique persistante, conséquence de la diminution de la volémie plasmatique et de la perte des hématies transportant l'oxygène. Pour tenter de compenser le manque d'oxygène au niveau tissulaire, le métabolisme anaérobie sera activé. Une acidose lactique, la production de radicaux libres et de protons sont ainsi observées entraînant inflammation et mort cellulaire dont les conséquences (défaillance multi-viscérale et coagulopathie) engagent le pronostic

vital du patient. En conséquence, améliorer l'oxygénation tissulaire en cas de choc hémorragique présente un intérêt majeur dans la prise en charge du choc hémorragique. Parmi les pistes potentielles, un substitut d'hémoglobine peut être un excellent candidat. Le substitut utilisé pour ce projet a démontré sa grande capacité de fixation de l'oxygène (156 molécules d'O<sub>2</sub> à saturation). Si son innocuité a été montrée (pas de mortalité après injection chez la souris), l'effet hyper- ou hypotenseur de la molécule doit être testé. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'effet de deux formulations du même substitut d'hémoglobine sur la pression artérielle. In fine, l'objectif est de réaliser des travaux précliniques permettant d'évaluer l'intérêt et l'innocuité de deux formulations d'un substitut de l'hémoglobine avant de proposer, en fonction des résultats, des essais cliniques.

Ce projet a une durée de 12 mois. Il impliquera l'utilisation de 48 rats Sprague Dawley.

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.

7206. Le but du projet est d'évaluer la régénération tissulaire et vasculaire d'un tissu lésé et d'étudier l'effet de l'apport de cellules spécifiques au niveau du tissu lésé dans un cadre à visée thérapeutique.

La lésion tissulaire sera réalisée au niveau de la patte de l'animal anesthésié au préalable. L'administration des cellules est faite localement au contour de la lésion et dans les muscles adjacents.

Pour évaluer cet effet dans des conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*.

L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques. Des souris immunodéficientes Nude seront utilisées car ce modèle permet la greffe de cellules humaines. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 1302.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale.

Différents paramètres fonctionnels (techniques non invasives) seront mesurés pour évaluer la régénération tissulaire et vasculaire ainsi que le bénéfice de l'utilisation de cellules spécifiques dans le cadre du traitement par thérapie cellulaire. Les études moléculaires se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié avant euthanasie.

7207. La radiothérapie est le traitement incontournable dans la prise en charge des pathologies cancéreuses de la zone abdomino-pelvienne (cancer de la prostate, de la vessie, de l'endomètre de l'utérus etc.). L'objectif des cliniciens est la recherche d'un compromis optimal entre le contrôle tumoral et les dommages aux tissus sains, situés autour de la tumeur. En effet, l'irradiation des zones saines entraîne chez les patients traités, une perte de l'intégrité intestinale (organe de la zone abdomino-pelvienne très radiosensible). Ainsi les patients traités par radiothérapie pour des cancers de la zone abdominale-pelvienne développent pour 10 à 20% d'entre eux des complications intestinales (diarrhée, constipation, ulcères, douleurs abdominales) plusieurs années après la fin du traitement (10 à 20 ans). Ces complications chroniques associées à des douleurs abdominales intenses modifient la qualité de vie des patients et peuvent dans certains cas compromettre leur pronostic vital. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. L'objectif des recherches menées est le développement de nouveaux traitements pour les patients subissant une radiothérapie et développant des complications gastro-intestinales chroniques. L'utilisation des cellules souches issues de la moelle osseuse est une approche prometteuse notamment du fait de leur impact sur la réparation structurale et fonctionnelle des atteintes digestives induites par une irradiation. L'étude proposée ici, vise à analyser l'efficacité thérapeutique de ces cellules souches sur la douleur, dans un modèle d'ulcération colique radio-induite réalisé chez le rat (mâle).

Il a déjà été démontré dans ce modèle expérimental, qu'un traitement par cellules souches réduit partiellement la douleur abdominale radio-induite. Ce travail s'attachera plus particulièrement à comprendre les mécanismes d'action de ces cellules sur la réduction de la douleur abdominale radio-induite, et ce dans le but d'améliorer leur efficacité thérapeutique.

Les connaissances acquises lors des précédentes expérimentations permettront de limiter le nombre d'animaux. 948 rats seront utilisés pour comprendre les mécanismes d'action des cellules souches conduisant à une réduction de la douleur. Cette étape est un prérequis indispensable pour développer un traitement adapté.

Un suivi particulier des animaux sera assuré avec de limiter le plus possible la souffrance des animaux.

7208. Ce projet s'inscrit dans l'étude du rôle du système vasculaire dans la régénération tissulaire d'un tissu lésé après exposition aux rayonnements ionisants.

La lésion tissulaire sera réalisée au niveau de la peau du dos de l'animal anesthésié et irradié au préalable. Cette technique sera réalisée sur des animaux contrôles, sur des animaux mutés pour différents gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, le stress oxydatif et la mobilisation de cellules souches essentiels au processus de vascularisation.

Pour évaluer le rôle du système vasculaire dans des conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*.

L'espèce choisie est la souris.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 370.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables.

Différents paramètres fonctionnels seront mesurés par les techniques non invasives pour évaluer la régénération tissulaire et vasculaire. Les études moléculaires se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié.

7209. Il s'agit dans ce projet de comparer l'impact des différentes méthodes de thrombectomie sur les parois des artères carotides. Méthodes qui sont utilisées dans le cadre des accidents vasculaires chez les humains. La thrombectomie est la manipulation qui permet d'éliminer un caillot (thrombus) dans une artère. Pour ce faire, nous utiliserons des porcelets d'environ 50 kg sous anesthésie générale. Les neurochirurgiens vont provoquer un accident vasculaire en injectant un thrombus par la veine fémorale du porcelet. Puis éliminer ce thrombus par 2 méthodes de thrombectomie différentes, à savoir la méthode "stent retriever" et la méthode de "thrombo-aspiration". Cette intervention se fera sous contrôle d'un amplificateur de brillance. L'étude s'effectuera sur des artères de porcelet de taille comparable à celles des humains. A la fin de la thrombectomie, l'animal sera euthanasié puis les artères traitées seront prélevées. Une étude histologique sera effectuée sur les différents prélèvements pour mettre en évidence les éventuelles lésions dues aux méthodes de thrombectomie.

Ce projet s'effectue sur deux établissements utilisateurs (EU) distincts, dépendants du même Comité d'Ethique. Le projet fait l'objet de deux demandes d'autorisation de projet ; l'une pour la partie expérimentation qui est réalisé sur un EU et l'autre pour la partie l'hébergement et le suivi qui sont réalisés sur l'autre EU, tous deux EU agréés.

Ce projet s'effectuera sur des porcelets d'environ 4 mois (50 kg). Nous ne pouvons, à ce jour, remplacer la méthode *in vivo* par d'autre méthode n'utilisant pas d'animaux. Les porcelets seront opérés dans les mêmes conditions que pour les humains. Ils seront prémédiqués, puis mis sous anesthésie générale. Nous leur administrerons également des antidouleurs.

Ce projet nécessitera 2 lots de porcelets :

Le premier lot subira la thrombectomie sous anesthésie générale puis sera euthanasié au bout d'une heure (procédure sans réveil).

Le deuxième lot subira la thrombectomie sous anesthésie générale, sera réveillé. Des soins post-opératoires leur seront prodigués. Les porcelets seront soignés et suivis dans un établissement agréé. Puis au bout de 15 jours, ils seront remis sous anesthésie générale pour la deuxième phase. C'est-à-dire l'anesthésie puis le prélèvement des artères traitées et l'euthanasie. Ce deuxième lot permettra de mettre évidence, les éventuelles lésions qui pourraient apparaître entre le jour de la thrombectomie J0 et J+15. Cette demande d'autorisation de projet concerne uniquement la partie concernant l'hébergement et le suivi des animaux durant ces 15 jours.

Ce projet nécessitera au maximum 6 porcelets (2 lots de trois). Ce chiffre sera revu à la baisse et uniquement à la baisse afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

7210. L'objectif est d'étudier dans quelle mesure des primates non-humains qui n'ont pas développé à l'état naturel l'utilisation d'une monnaie, peuvent tout de même présenter des attitudes de spéculation et de thésaurisation dans le cadre de prise de décision dans le risque, et de déterminer les mécanismes décisionnels qui sous-tendent de tels comportements.

Cette étude sera réalisée sur 2 primates d'espèce *Macaca mulatta*. La tâche à effectuer par les deux primates sera une tâche en chaise de contention devant un écran, uniquement comportementale. Chaque essai constituant cette tâche consiste à faire un choix par appui tactile dont les conséquences se répercutent sur le niveau d'une jauge. Au bout d'une dizaine d'essais, le singe obtient une quantité d'eau proportionnelle au niveau de la jauge.

L'étude est effectuée sur des primates humains pour les raisons suivantes : (1) aucun primate non-humain n'a à notre connaissance recours à l'utilisation d'une monnaie à l'état naturel, un mammifère de cette ordre constitue ainsi un bon modèle de sujet naïf ; (2) un primate non-humain est un modèle de rationalité limitée ; (3) travailler chez le primate non-humain permet que l'étude comportementale puisse servir de base à une future étude en électrophysiologie des mécanismes de prise de décision impliqués. Nous avons choisi de travailler spécifiquement sur le macaque rhésus car *Macaca mulatta* est une espèce très étudiée dans le champ de la neuro-économie. L'utilisation de macaques dans notre étude permet ainsi de pouvoir prendre appui sur cette littérature.

Les macaques participant à l'étude seront au nombre de deux, nombre d'animaux qui permet d'atteindre un équilibre en reproductibilité des résultats et réduction du 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, « jouets », fond sonore, etc.)

7211 Un trauma médullaire ou traumatisme de la moelle épinière, à l'origine de troubles moteurs et sensitifs ainsi que de troubles neurovégétatifs conduit à la mise en jeu du pronostic vital des patients. Les études cliniques et expérimentales chez l'homme mettent en évidence le rôle de la « lésion secondaire » dans la constitution du déficit neurologique. En effet, si certains neurones de la zone traumatisée sont immédiatement détruits (lésion primaire), d'autres sont victimes de modifications secondaires vasculaires, biochimiques, électrolytiques et inflammatoires qui aboutissent à leur destruction en quelques minutes ou quelques heures. De nombreux traitements médicamenteux spécifiques, visant à prévenir les lésions secondaires ont été proposés mais très peu se sont révélés efficaces. L'extension limitée des lésions secondaires grâce à des administrations précoces et pré-hospitalières est actuellement recommandée et largement proposée lors de la prise en charge des traumas médullaires. Cette étude portera donc, sur l'élaboration et la validation d'un traitement par un ensemble de composés neuroprotecteur et neurorégénérateur après traumatisme de la moelle épinière. Les effets sur les voies nerveuses sensitives et motrices des composés seront testés séparément ou en association (trithérapie) sur un modèle expérimental de lésion de la moelle épinière réalisée au niveau thoracique chez le rat. Dans

ce projet, un total de 192 animaux sur 2 ans pour l'ensemble de l'étude est à prévoir. Le rat constitue un bon modèle d'étude des lésions de la moelle épinière car il possède une organisation anatomique et nerveuse comparable à celle de l'homme. De plus, le pouvoir régénérateur de cette structure nerveuse chez le rat restant équivalent à celui de l'homme, la transposition des résultats expérimentaux chez ce dernier s'en trouvera d'autant plus facilitée. De plus, la trithérapie proposée présente l'avantage d'être constituée de deux médicaments déjà utilisés et bien tolérés chez l'homme. Par notre forte expérience dans la mise en œuvre d'expérimentation animale et par l'emploi approprié d'anesthésiques et d'analgésiques, nous réduisons de façon maximale les conditions de stress auxquelles sont soumis les rats. La validation d'un traitement précoce à base de composés neuroprotecteurs et neurorégénérateurs devrait permettre de réduire les effets des lésions secondaires et améliorer la récupération fonctionnelle des patients souffrant d'atteintes de la moelle épinière.

7212. Parmi les enjeux sociétaux actuels majeurs figurent l'urgence de comprendre les mécanismes qui sous-tendent le développement des maladies métaboliques type obésité. Cela donne lieu au développement de nouvelles drogues ou dispositifs tels encore dernièrement cette pilule qui une fois ingérée, se gonflerait dans l'estomac et donc renforcerait le signal de satiété. Si on peut être sceptique quant aux réels effets de ce type de stratégie, des avancées majeures ont en revanche été réalisées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition des désordres métaboliques, en particulier au niveau des réseaux neuronaux impliqués dans le contrôle de la faim. Des travaux récents conduits chez un prosimien saisonnier ont permis de mettre en avant des caractéristiques intéressantes de la régulation du métabolisme. Cette étude a permis de caractériser ce phénotype saisonnier qui se traduit par l'existence d'une phase nette d'engraisement dans la première moitié de l'hiver, cette tendance s'inversant spontanément, sans qu'aucun paramètre de l'environnement ne soit modifié. La phase d'engraisement est notamment caractérisée par une très forte efficacité alimentaire, une activité métabolique limitée et une tendance à constituer des réserves graisseuses. En contraste, la phase de dégraissage est caractérisée par le développement d'une intolérance au glucose associée à des niveaux de base en insuline plus élevés. Il y a donc séparation des phases obésogène et diabétogène dans la saisonnalité de ce prosimien, ce qui est relativement paradoxal vis-à-vis des modèles classiques d'obésité. Fait intéressant, cette espèce est capable d'inverser spontanément ces deux phénotypes, sans jamais que le seuil pathologique ne soit atteint. Bien que les mécanismes qui sous-tendent ces variations saisonnières ne soient pas encore connus, le rôle des modifications épigénétiques comme voie de modulation de l'expression génique semblent être un candidat sérieux que nous proposons d'explorer.

Parallèlement aux modifications métaboliques observées, une variation de la longueur des télomères a également été démontrée, suggérant un lien direct entre activité métabolique et stabilité génomique dans un contexte saisonnier. Ce résultat pose la question de l'origine de la flexibilité métabolique observée, à savoir est-elle liée à une flexibilité génomique qui se traduirait par l'activation de mécanismes réparateurs de l'ADN. En outre, parmi les facteurs impliqués dans la flexibilité métabolique, le maintien de l'intégrité génomique (en particulier par des processus de réparation somatique) est crucial, faisant de la fonction télomérique un paramètre clé dans la survie des espèces. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'homéostasie télomérique est soumise à la régulation épigénétique, en particulier par le biais des modifications des histones. Ces mécanismes seraient d'autant plus pertinents chez des espèces saisonnières, caractérisées par une très grande discrimination entre les phases de repos métabolique hivernales et les phases estivales de reproduction. L'ensemble de ces résultats prometteurs confirme l'opportunité unique d'explorer les mécanismes qui sous-tendent la capacité de ce prosimien saisonnier à inverser spontanément le processus d'engraisement, et souligne l'importance de poursuivre cette étude.

Pour cela nous prévoyons de développer une stratégie expérimentale longitudinale qui nous permettra de tester l'effet de la saison, du sexe et de l'âge sur les modifications épigénétiques et leur rôle dans les interactions entre métabolisme et stabilité génomique.

Pour cela, 8 animaux de chaque groupe d'âge (adultes et âgés, N=16) et de sexe (mâles et femelles, N=16) seront expérimentés dans une série de 3 procédures qui nous permettront de :

- 1) Définir l'état métabolique de chaque animal (par calorimétrie indirecte),
- 2) Etablir la signature épigénétique circulante de chaque animal (par prélèvement sanguin),
- 3) Relier l'état de l'activité mitochondriale et les effets sur la production de stress oxydant et la longueur des télomères (par culture cellulaire à partir de biopsies cutanées).

Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux mais assurer tout de même un pouvoir statistique suffisant pour les effets attendus, ces procédures expérimentales seront réalisées sur un nombre maximal de 8 animaux par groupe expérimental (sexe, âge), ce qui fait un total de 32 animaux pour l'ensemble du projet (en prenant en compte la répétition des procédures entre la fin de l'été et le milieu de l'hiver).

Le but de cette étude étant de caractériser au plan moléculaire les modifications physiologiques et épigénétiques spontanées qui apparaissent au cours des saisons, une grande attention sera portée au maintien des conditions optimales pour le bien-être des animaux en essayant d'être le moins intrusif possible.

L'indicateur privilégié pour le suivi du bon rétablissement de l'animal après application des procédures expérimentales sera les variations anormales de masse corporelle. Dans le contexte saisonnier, les variations de poids peuvent aller jusqu'à 10% de variation en une semaine. Une perte de poids sera considérée comme pathologique à partir du moment où ce seuil sera dépassé. Ce critère sera pris en compte avec d'autres critères comme la prostration, l'état de forme général de l'animal (réactivité, agressivité, etc). Enfin, un maximum d'attention sera également apporté à la maîtrise des techniques utilisées afin de limiter au maximum le stress et la douleur chez les animaux expérimentés.

7213. L'objectif principal de notre équipe de recherche est de développer de nouveaux traitements contre le cancer.

La cible à détruire est la cellule tumorale, l'arme est le radioélément qui va émettre un rayon « toxique » pour cette cellule.



Il faut accrocher le radioélément à un ligand et à un vecteur afin de former un radiopharmaceutique qui doit cibler et détruire la cellule tumorale tout en minimisant l'impact sur les tissus sains.

Nous disposons de différents vecteurs (Anticorps entiers, fragments, Affitins, liposomes, etc...), de plusieurs ligands et de plusieurs radioéléments, certains connus qui servent de références et des nouveaux.

L'objectif de ce projet est de cibler le myélome multiple murin en utilisant 2 modèles de souris possédant un système immunitaire fonctionnel.

La radioimmunothérapie cible la tumeur grâce à des vecteurs spécifiques associés à ces radioéléments alpha et bêta, qui ont des énergies et des parcours d'émissions différents.

Nous ferons et comparerons les RIT alpha et bêta pour lesquelles les radioéléments ont des énergies et des parcours d'émission différents.

Différentes études seront menées :

Des études de RIT alpha et bêta avec différents vecteurs, seules ou associées à des immunostimulations.

- Question A : RIT bêta du Myélome Multiple Avec un nouveau radioélément.

\* études de survie

- Question B : RIT- $\alpha$  + RLI dans le Myélome Multiple

Traitement : association RIT- $\alpha$  au Bismuth-213 et immunothérapie par injection de RLI (immunostimulant formé de l'IL-15 et du IL-15-R $\alpha$ )

- Question C : RIT- $\alpha$  + Transfert adoptif de lymphocytes T (ACT) :

Association RIT- $\alpha$  au Bismuth-213 et immunothérapie par transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de la tumeur (OT-I)

\* étude de survie

\* analyse des populations cellulaires

- Question D : RIT- $\alpha$  anti-PD-L1 (nouveau vecteur)

\* étude de survie

- Question E : RIT- $\alpha$  avec vecteur de référence anti CD138 + immunothérapie anti-PD-L1 ou anti-PD1 (nouveaux vecteurs)

a.Effet de l'immunothérapie anti-PD-L1 ou anti-PD1

b.RIT- $\alpha$  + immunothérapie anti-PD-L1 ou anti-PD1

- Question F : Etude de nouvelles cibles pour la RIT du myélome

Il s'agit de nouveaux antigènes tumoraux reconnus par les anticorps anti-mCD269, anti-mCD319.

\* études de survie

- Question G : Etude du fractionnement de dose en RIT alpha dans le myélome multiple

\* études de survie

700 souris seront nécessaires pour réaliser ces études.

Pour ces thérapies, toutes les souris recevront une greffe de cellules tumorales par voie intraveineuse et 10 jours plus tard le traitement de RIT par voie intraveineuse.

Les traitements immunostimulants se feront soit par voie intrapéritonéale soit par voie intraveineuse.

Le suivi des études de survie se fera avec des pesées et une observation attentive des animaux 2 fois par semaine puis, chaque jour, dès que la maladie se déclenche chez les souris témoins non traitées.

Nous pratiquerons une euthanasie dès l'apparition des points limites classiques ou spécifiques.

Les analyses des populations cellulaires seront effectuées après euthanasie sur le sang, la rate et la moelle osseuse.

Le modèle animal est indispensable et non substituable pour déterminer quel système est le plus efficace pour détecter et détruire la tumeur et le moins toxique pour les organes vitaux avant de commencer des études chez l'homme.

Règle des 3R :

Réduire le nombre d'animaux utilisés en réalisant préalablement des tests *in vitro* sur les cellules tumorales.

Le nombre d'animaux nécessaires à cette saisine prend en compte cette règle.

Raffiner en assurant une surveillance quotidienne par l'expérimentateur dès la période critique et en fixant des points limites stricts qui conduisent à l'euthanasie.

7214. Le pronostic du mélanome à un stade avancé reste sombre. L'immunothérapie, utilisant les anticorps anti-CTLA4 et anti-PD1, offre des perspectives prometteuses avec des réponses prolongées voire des rémissions pour les mélanomes non porteurs de mutations éligibles aux inhibiteurs de BRAF. Cependant, seule une faible proportion de patients est répondeuse avec un délai souvent long, ne permettant pas toujours d'obtenir la rémission. Les chimiothérapies obtenues auparavant dans le mélanome métastatique ciblaient essentiellement l'apoptose des cellules tumorales. Afin de contourner les phénomènes de résistance à l'apoptose, l'inhibition de la transcription génique par interférence à l'ARN (siARN) constitue une innovation prometteuse. L'utilisation de nanovecteurs lipidiques (LNC) permet l'administration par voie systémique de siARN inhibant l'expression de Bcl-2, avec pour conséquence une réduction significative du volume tumoral du mélanome murin. Son association à différentes molécules de chimiothérapie, tels les ferrocifènes, permet une action encore plus ciblée sur l'apoptose.

Notre projet vise à établir des preuves précliniques d'efficacité thérapeutique des LNC (contenant siARN et ferrocifènes) et à évaluer les bénéfices d'une combinaison de cette thérapie vectorisée à un anticorps anti-CTLA4 dans un modèle murin de mélanome.

Nous souhaitons, ainsi, mettre en évidence une activité anti-tumorale significative et synergique par la combinaison de nanovecteurs, favorisant l'apoptose des cellules tumorales à un anticorps monoclonal anti-CTLA4, stimulateur de l'immunité cellulaire anti-tumorale. Ces résultats permettront d'identifier de nouvelles stratégies innovantes de prise en charge du mélanome métastatique.

Ce projet sera réalisé sur 160 rongeurs (souris).

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

- Le traitement d'organismes intégrés par de faibles doses de toxiques a un caractère de stricte nécessité afin d'évaluer les effets au niveau des différents tissus et organes et ne peut pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information ;
- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum (n=10 par groupe) sans compromettre les objectifs du projet.
- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

7215. La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire la plus fréquente chez l'enfant, touchant environ un garçon sur 5000 à la naissance. Elle résulte d'une mutation dans le gène *Dmd*, codant pour la protéine Dystrophine et situé sur le chromosome X. La protéine Dystrophine est liée à la membrane des fibres musculaires et par sa liaison à un gros complexe protéique constitue un lien important entre le cytosquelette de la fibre musculaire et la matrice extracellulaire. La non-expression de la Dystrophine génère une fragilité de la fibre musculaire, ayant pour conséquence une nécrose des fibres musculaires, compensée dans la petite enfance par un processus de régénération. Au cours des années, ce dernier ne suffit plus à compenser le processus dystrophique, et le tissu musculaire est progressivement remplacé par du tissu fibreux et adipeux. Le déficit en Dystrophine fonctionnelle se traduit finalement par l'apparition chez un petit garçon de moins de cinq ans de chutes ou de diminution significative des capacités motrices attendue à cet âge (course, saut, montée des escaliers...). La marche est définitivement perdue avant 15 ans et le décès survient généralement au cours de la troisième décennie, suite à une insuffisance respiratoire et/ou cardiaque.

Deux modèles animaux de la DMD, portant une mutation dans leur gène *Dmd*, sont essentiellement utilisés à ce jour : la souris *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) (*mdx*) et le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy). La souris *mdx* est loin d'être un modèle parfait puisqu'elle présente un phénotype peu sévère, avec seulement quelques aspects des lésions musculaires humaines et une fonction cardiaque peu et très tardivement atteinte. De plus, la petite taille de ce modèle limite un certain nombre d'analyses (modes d'injection, volumes sanguins prélevables...). Le chien GRMD, quant à lui, se rapproche beaucoup plus de la pathologie humaine, à la fois au niveau des lésions musculaires observées qu'au niveau de son phénotype (espérance de vie très raccourcie). Il présente cependant des lésions cardiaques hétérogènes entre individus et la grande taille de ce modèle pose des problèmes d'entretien, de coût, ainsi qu'éthiques. De ce fait, seules des petites cohortes expérimentales peuvent être utilisées, rendant impossibles les analyses statistiques. Malgré tout, le chien GRMD reste à ce jour le seul modèle animal de DMD utilisable pour la validation préclinique des essais de thérapies génique et cellulaire.

Récemment, un modèle de rat DMD a été généré par transgénèse à l'aide de TALENs (Transcription Activator Like-Effector Nucleases). Chez ce rat DMD*mdx*, les dommages musculaires sont très proches de ceux des patients DMD (nécrose, régénération, puis fibrose et adipeuse). Les animaux montrent une réduction significative de la force musculaire et également une atteinte cardiaque dès l'âge de 3 mois. Ce nouveau modèle animal de la DMD se révèle particulièrement intéressant, puisqu'il mime plus fidèlement la pathologie humaine que la souris *mdx*, tout en présentant moins de limitations d'utilisation que le modèle canin. Cette étude permettra également de cumuler des données contrôles de référence pour les futurs essais précliniques d'évaluation de traitements potentiels de la DMD qui seront réalisées dans ce modèle animal.

Si une caractérisation préliminaire de ce nouveau modèle animal a été faite lors de sa génération, nous souhaitons aujourd'hui en réaliser une caractérisation exhaustive, que ce soit au niveau phénotypique (fonction musculaire et cardiaque), au niveau histologique, au niveau physiologique (notamment au niveau de l'homéostasie calcique qui est une variable importante dans le DMD) et au niveau moléculaire (marqueurs tissulaires et circulants).

Un total de 160 animaux seront inclus dans cette étude (80 rats mâles DMD*mdx* et 80 rats mâles sains issus de portées communes aux rats DMD*mdx*). Ces animaux seront répartis en différents groupes de 8 animaux, qui seront suivis 1,5 mois, 3 mois, 4,5 mois, 7 mois ou 12 mois avant euthanasie et réalisation de prélèvements de tissus en post-mortem. Des prélèvements sanguins exhaustifs seront également réalisés afin de réaliser des dosages hématologiques et biochimiques et préparer du sérum pour les analyses de marqueurs circulants de la maladie. Certains des animaux (32 rats DMD*mdx* et 32 rats sains) subiront de leur vivant des mesures de force (test d'agrippement) non invasifs et des mesures de la fonction cardiaque (ECG + échocardiographie) non invasifs.

Afin de suivre la règle des 3R :

- Réduction : Le nombre d'animaux par groupe a été évalué pour être un minimum (8 animaux par groupe) permettant d'assurer la robustesse des résultats. Une étude statistique sera réalisée en utilisant un test non paramétrique de type Mann-Whitney.

- Raffinement : Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en places en fonction des procédures expérimentales.

L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entraîner de la souffrance, l'état général de chaque animal sera surveillé pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie, et éventuellement anticiper l'euthanasie de l'animal (application de points limite).

- Remplacement : Ce projet de caractérisation exhaustive du rat DMD*mdx* (à différents âges et avec des évaluations larges) nous permettra à terme de réaliser l'évaluation préclinique de traitements potentiels de la DMD dans un modèle animal adapté, et donc de raffiner le nombre d'animaux utilisés dans ces futurs projets. De plus, le développement et la bonne caractérisation de ce modèle animal vise à terme à réduire voire remplacer l'utilisation de chiens GRMD pour les évaluations précliniques de potentiels traitements, ne pouvant pas encore à ce jour être évalués *in vitro* ou *in silico* (la complexité de la maladie ne pouvant pas à ce jour être reproduite *in vitro* ou *in silico*).

7216. Le syndrome métabolique (SMet) associe des troubles cardiovasculaires (hypertension artérielle) et métaboliques (obésité viscérale, intolérance au glucose, dyslipidémie...) ; il prédispose au diabète de type 2 et aux affections cardiovasculaires. Sa prévalence est en augmentation constante, ce qui en fait un problème de santé publique. Les mécanismes responsables du développement du SMet sont peu identifiés et il n'existe actuellement aucun traitement spécifique et global. Une activité exagérée du système nerveux sympathique (SNS) a été associée à plusieurs troubles cardio-métaboliques de manière isolée, mais aucune relation de causalité entre ces différents paramètres n'a été établie à ce jour.

Notre projet vise à tester l'hypothèse d'une relation causale entre l'hypersympathicotomie chronique et le développement d'une résistance tissulaire à l'insuline, responsable secondairement de troubles métaboliques de type obésité viscérale, diabète et dyslipidémies, et enfin de complications cardiovasculaires (athérosclérose, infarctus du myocarde, AVC...). Pour ce faire, nous utiliserons un modèle de souris transgénique déficiente en transporteur neuronal de recapture de la noradrénaline, le transporteur NET (souris KO-NET). Les études déjà publiées ont démontré l'existence d'une hyperactivité du SNS chez ces animaux, confirmant la pertinence de ce modèle expérimental pour notre projet.

La validation du rôle causal d'une hypersympathicotomie chronique dans le développement et/ou l'aggravation des troubles cardio-métaboliques constituant le syndrome métabolique pourra ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, notamment par inhibition chronique de l'hyperactivité sympathique ; elle pourrait également permettre de proposer de nouvelles pistes de recherche dans l'objectif d'un dépistage précoce des patients à risque.

Dans le cadre du respect des bonnes pratiques de laboratoire relatives à l'expérimentation animale, le respect de la règle des 3R se traduit de diverses manières. Nos protocoles sont tous standardisés et réalisés par des personnels expérimentés. Nos animaux sont hébergés à l'animalerie centrale dans des cages réglementaires de type II et bénéficient d'un milieu enrichi. Une surveillance quotidienne est assurée par les zootechniciens de la plateforme de l'animalerie ainsi que par les responsables du projet ou la technicienne du laboratoire. Nous avons réduit le nombre d'animaux à 12 par groupe, pour nous assurer un effectif final de 10 souris dans chaque groupe ; cet effectif minimal est nécessaire pour réaliser des analyses statistiques sur valeurs quantitatives (analyse de variance ANOVA, test de Student, analyse de corrélation), sans compromettre la validité des conclusions. Ceci nous conduira à un effectif final de 200 animaux, dont 144 souris mâles à partir de l'âge de 5 semaines pour l'expérimentation et 56 souris (40 femelles et 16 mâles) pour le maintien de la lignée.

L'utilisation de modèles murins est incontournable dans ce type d'étude. En effet, les mécanismes physiopathologiques et thérapeutiques impliqués sont complexes et multifactoriels, impliquant à la fois le système nerveux central et des (dys) régulations périphériques ; ils ne peuvent être modélisés par des méthodes *in vitro* et leur compréhension n'est possible que dans un modèle expérimental intégré.

7217. Le syndrome métabolique associe des troubles cardiovasculaires (hypertension artérielle) et métaboliques (obésité viscérale, intolérance au glucose, dyslipidémie...) ; il prédispose au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires (AVC, infarctus du myocarde), avec pour conséquence une morbi-mortalité importante. Sa prévalence est en augmentation constante, ce qui en fait un problème de santé publique. Il n'existe actuellement aucun médicament spécifique et global.

Les mécanismes responsables du développement du syndrome métabolique sont mal connus mais plusieurs travaux récents semblent impliquer une activation anormale du système nerveux sympathique. Au niveau du cerveau, le système nerveux sympathique est régulé notamment par les récepteurs II des imidazoles (RII). L'activation de ces récepteurs par un ligand sélectif, le LNP599, améliore effectivement plusieurs paramètres cardio-métaboliques (hypertension, obésité, tolérance au glucose, cholestérol, triglycérides) dans des modèles murins de syndrome métabolique. Ces résultats confirment que les RII pourraient constituer une nouvelle cible pour le traitement et/ou la prévention du syndrome métabolique et que les ligands des RII (LNP599 et ses analogues) représentent des candidats médicaments intéressants.

L'une des hypothèses sur la nature moléculaire du récepteur II concerne la nischarine. Cette protéine membranaire semble intervenir dans la régulation du système nerveux sympathique, comme les RII, mais aussi dans la régulation métabolique (sensibilité à l'insuline) en périphérie. Cette hypothèse n'a à ce jour jamais pu être confirmée ou infirmée, de par l'absence d'outils pharmacologiques et expérimentaux. Nous disposons depuis peu de rats transgéniques dont le gène codant pour la nischarine a été partiellement ou totalement supprimé. L'utilisation de ces animaux et des ligands hautement sélectifs des RII constituent des formidables outils pour tester cette hypothèse. Notre projet vise donc à déterminer si la nischarine est impliquée (i) dans le contrôle de la régulation cardiovasculaire et métabolique et (ii) dans les effets bénéfiques des ligands de type LNP. L'ensemble des travaux permettra de conclure quant à l'identité de la nischarine en tant que RII ou co-récepteur des RII.

Dans le cadre du respect des bonnes pratiques de laboratoire relatives à l'expérimentation animale, le respect de la règle des 3R se traduit de diverses manières. Nos protocoles sont tous standardisés et réalisés par des personnels expérimentés. Nos animaux sont hébergés à l'animalerie centrale dans des cages réglementaires, sans dépasser 2-3 rats par cage, et bénéficient d'un milieu enrichi (bâtons type « aspen bricks » à ronger). Une surveillance quotidienne est assurée par les zootechniciens de la plateforme de l'animalerie ainsi que par la responsable du projet ou la technicienne du laboratoire. Nous avons réduit le nombre d'animaux à 10 par groupe, pour nous assurer un effectif final de 8 rats dans chaque groupe ; cet effectif minimal est nécessaire pour réaliser des analyses de variance sur valeurs quantitatives, sans compromettre la validité des conclusions. Ceci nous conduit à un effectif final de 140 animaux, dont 120 pour les expérimentations et 20 (15 femelles et 5 mâles) pour le maintien de la lignée.

L'utilisation de modèles murins est incontournable dans ce type d'étude. En effet, les mécanismes physiopathologiques et thérapeutiques impliqués sont complexes et multifactoriels, impliquant à la fois le système nerveux central et des (dys) régulations périphériques ; ils ne peuvent être modélisés par des méthodes *in vitro* et leur compréhension n'est possible que dans un modèle expérimental intégré.

7218. En raison de l'utilisation croissante de nanoparticules dans les procédés industriels, le nombre des salariés pouvant être exposés augmente sans que pour autant les propriétés toxicologiques de ces substances soient parfaitement connues. Parmi celles-ci se trouvent les nanoparticules de dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) qui appartiennent à la liste des nanomatériaux manufacturés d'intérêt de l'OCDE.

Comme ces particules peuvent se retrouver en suspension dans l'air, la voie majeure d'exposition professionnelle est l'inhalation et les premiers tissus exposés sont ceux de l'appareil respiratoire. Une fois déposés dans le poumon, ces nanomatériaux peuvent également rejoindre la circulation sanguine et se distribuer dans l'organisme.

Les études de poste concernant les opérations mettant en œuvre des nanomatériaux sous forme de poudre indiquent que les aérosols auxquels sont potentiellement exposés les salariés sont composés en très grande majorité de particules sous forme agrégée ou agglomérée. Cependant il n'est pas à exclure qu'au cours de leur utilisation, des procédés mécaniques pourraient modifier la structure de la nanopoudre et conduire à la génération d'un aérosol ayant une granulométrie différente de celle obtenue lors de la manipulation de la poudre originale. Il est donc nécessaire de savoir si deux aérosols de granulométrie distincte mais obtenus à partir d'un même échantillon de nanopoudre peuvent avoir des propriétés toxicologiques différentes que ce soit en termes de réponse inflammatoire et de biopersistance pulmonaires que de toxicocinétique. Nous avons précédemment étudié la toxicité d'un aérosol de dioxyde de titane aggloméré, il convient donc maintenant de s'intéresser à celle d'un aérosol désaggloméré.

L'évaluation du danger que représentent de tels nanomatériaux nécessite de réaliser des études de toxicologie expérimentale par inhalation chez le rat de laboratoire qui constitue un modèle de choix pour l'extrapolation des résultats à l'Homme. La compréhension des effets pulmonaires et systémiques des nanoparticules chez l'animal de laboratoire et chez l'être humain est encore parcellaire et les études chez l'animal de laboratoire ne peuvent pas encore être substituées par des études sur des cultures de cellules. Des rats de laboratoire seront ainsi exposés par voie oro-nasale, 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines à un aérosol désaggloméré de dioxyde de titane. Les effets toxicologiques pulmonaires et systémiques d'une telle exposition seront suivis jusqu'à 180 jours après la fin des expositions. Cette approche expérimentale nécessite, pendant les périodes d'exposition, la mise en contention des animaux dans des tubes prévus à cet effet. En raison de cette contrainte, le bien-être des animaux sera assuré avec le suivi de l'atteinte des point limites comprenant une perte de 20% du poids corporel au cours des procédures, l'apparition d'une détresse respiratoire, de signes de souffrance (prostration, piloérection, plaies), de lésions cutanées ou de tumeurs.

Lors de la rédaction de ce projet, la règle des 3R a été prise en compte. Le principe de Remplacement est cependant difficilement applicable ici car la compréhension des effets pulmonaires, et systémiques des nanomatériaux inhalés chez l'animal de laboratoire et chez l'Homme est encore parcellaire et les études chez les rongeurs ne peuvent pas encore être substituées par des études sur des cultures de cellules en raison de la complexité des mécanismes physiologiques considérés.

Le principe de Réduction est mis en œuvre en limitant les expérimentations à celles nécessaires à l'étude de la toxicité d'un aérosol désaggloméré de dioxyde de titane. Les données obtenues dans ce projet seront comparées à celles générées dans un projet précédent s'étant intéressé à la toxicité d'un aérosol aggloméré.

Le principe de Raffinement est mis en œuvre en limitant au maximum le stress des animaux à la contention pour les études par voie oro-nasale par exemple en habituant les animaux à la contention.

Un total de 135 rats mâles (souche Fischer 344) de 13 semaines sera nécessaire à l'ensemble du projet.

7219. En entreprises, les multi-expositions sont fréquentes et il n'est pas rare que des salariés soient exposés, au poste de travail, à une combinaison bruit plus solvant. D'un point de vue de la prévention, ces multi-expositions ne sont pas prises en considération par la législation, notamment les effets sur l'oreille interne, là où sont localisés les récepteurs de l'audition (cochlée) et de l'équilibre (vestibule). Ce projet a pour but d'étudier les effets sur l'audition et l'équilibre d'une co-exposition à des bruits riches en basses fréquences avec un solvant, le disulfure de carbone (CS<sub>2</sub>). Ces types de bruits sont très répandus en entreprises, ils correspondent à des bruits de ventilation, de moteur, bruit inhérent au transport, bruit d'éolienne..., et le disulfure de carbone, est utilisé dans la fabrication de cellulose et, plus particulièrement, de fibres synthétiques de viscose. Ce solvant est connu pour générer, entre autres, des surdités dans les basses fréquences et des troubles de l'équilibre chez l'homme.

Le projet se propose d'étudier la toxicité cochléaire (audition) et vestibulaire (équilibre) du CS<sub>2</sub> seul, ou en co-exposition avec des bruits riches en basses fréquences. Il s'agira d'évaluer l'impact du CS<sub>2</sub> sur les effets cochléo-traumatisants des bruits, et réciproquement, sur les systèmes sensoriels impliqués à la fois dans l'audition et dans l'équilibre. D'un point de vue plus appliqué, la pertinence de la dose de bruit journalière autorisée (Leq 8h), de la valeur limite d'exposition professionnelle court terme [VLEP CT] du solvant, sera également éprouvée pour une co-exposition " bruit BF plus CS<sub>2</sub>".

Compte tenu des effets toxiques des expositions au CS<sub>2</sub> et au bruit, seules des expérimentations avec un modèle animal étaient envisageables. Les fonctions physiologiques de l'audition et de l'équilibre ne peuvent être envisagées que sur un modèle *in vivo*, d'autant plus que nos mesures physiologiques seront complétées par des mesures de comportement. Le modèle choisi est le rat Long-Evans femelle, âgé de 4-5 mois. Les rats seront hébergés par 2 dans des cages de polycarbonate et seront maintenus à l'animalerie pendant au moins une semaine avant d'entrer dans la phase expérimentale. Les cages ouvertes et transparentes leur permettront de créer les liens sociaux nécessaires à leur bien-être. La litière utilisée sera constituée de carrés de cellulose irradiée (BCell8). Les animaux seront maintenus dans un cycle jour-nuit de 12 heures à une température de 22 ± 2°C et une hygrométrie de 55 ± 15%. Ils disposeront de nourriture et d'eau ad libitum, et des tunnels en carton enrichiront leur milieu environnemental.

Les animaux seront exposés à un bruit dont le spectre s'étend de 500 à 2 kHz, et dont la dose de bruit sur 8 heures (Leq 8h) est de 85 dB. Ils seront également exposés à des concentrations de CS<sub>2</sub> de 63, 250, 500 et 750 ppm, 6 heures par jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines, et à des co-expositions ayant les mêmes caractéristiques.

Les fonctions cochléaire et vestibulaire seront évaluées par une différence de performances (otoémissions et nystagmus) avant et après exposition, et au terme d'une récupération de 4 semaines post-exposition. Le protocole nous permettra d'évaluer les effets temporaires (après 4 semaines d'exposition) des effets permanents (après 4 semaines de récupération).

Afin d'évaluer les perturbations de l'absorption du CS2 et de son métabolisme, les rats seront mis en cage à métabolisme et un prélèvement sanguin sera effectué. Urine et sang seront donc collectés.

De plus, pour évaluer le fonctionnement du système vestibulaire aux niveaux périphérique et central, des études comportementales viendront compléter les mesures physiologiques (oto-émissions et nystagmus). Ces tests comportementaux seront réalisés avant, au terme des périodes d'exposition, et à la fin de la période de récupération. Le degré de sévérité des procédures expérimentales mises en œuvre dans cette étude est soit léger soit modéré. En outre, si des signes neurologiques apparaissent pendant l'exposition, les animaux feront l'objet d'une surveillance post-exposition. Si ces signes neurologiques, considérés comme points limites dans cette étude, persistent jusqu'au lendemain matin, les animaux seront alors mis à mort. Quoi qu'il en soit, à l'issue des expérimentations, tous les animaux seront euthanasiés pour réaliser des études histologiques de la cochlée, du vestibule et du cerveau.

Un calcul de puissance statistique a réduit le nombre de rattes Long Evans à 431 animaux pour les 3 ans d'expérimentation comportant des expositions au bruit seul, à différentes concentrations de solvant pendant 6 heures ou pendant des périodes de 15 min pour tester les VLEP CT, et aux co-expositions bruit et solvant.

7220. Les mycotoxines sont des contaminants majeurs des céréales qui entrent dans la composition de l'alimentation humaine ou animale. Il existe des interactions de ces mycotoxines sur l'homéostasie du métabolisme lipidique. Le foie et l'intestin sont des organes majeurs dans la régulation du métabolisme. Chez l'homme comme chez la souris, le foie stocke des nutriments sous diverses formes, et joue un rôle de tampon dans la régulation de l'homéostasie énergétique. L'intestin lui joue un rôle majeur dans l'absorption et l'excrétion des lipides neutres et des acides gras.

Les récepteurs nucléaires de classe II sont capables de réguler l'expression de nombreux gènes du métabolisme des lipides lorsqu'elles sont activées par la fixation d'un ligand spécifique.

Dans le cadre de ce protocole, nous souhaitons étudier l'impact de la régulation des récepteurs nucléaires modulant les voies de biosynthèse des lipides sur la toxicologie des mycotoxines. Au cours des 3 prochaines années, nous prévoyons ainsi de mesurer la toxicologie des mycotoxines sur 300 souris.

Les différentes expériences consistent à moduler les voies du métabolisme des lipides en activant de façon spécifique et différentielle certains récepteurs nucléaires de classe II et de mesurer l'impact toxicologique des mycotoxines d'intérêts à des doses réglementaires, sub-réglementaires, ou retrouvées classiquement dans l'alimentation animale. L'utilisation d'un modèle *in-vivo* est indispensable pour ce type d'étude et nous avons veillé à ce que notre plan expérimental fasse appel au nombre d'animaux minimum garantissant toutefois une interprétation de résultats basée sur des données robustes. De même, nous veillerons au bien-être des animaux, notamment en leur procurant les conditions d'hébergement les plus optimales. Des analyses transcriptomiques, lipidomiques, biochimiques et métabolomiques seront réalisées sur des prélèvements *post-mortem* de différents tissus biologiques.

7221. Les allogreffes sont les greffes les plus courantes. Elles concernent les cas où donneur et receveur font partie de la même espèce biologique mais, étant deux individus distincts, donneur et receveur possèdent un système de reconnaissance immunitaire différent. Pour cette raison, la greffe s'accompagne d'un traitement immunosuppresseur visant à prévenir une des complications majeures de la greffe : le rejet. Cependant, les traitements actuels présentent des effets secondaires importants et n'inhibent que partiellement le rejet chronique en transplantation. Il est donc important de développer de nouvelles thérapies pouvant améliorer l'immunosuppression et induire la tolérance immunitaire. Des premiers essais ont montré que l'utilisation d'anticorps spécifiques à action ciblée dans l'organisme pourrait induire la survie à long terme de greffons.

Dans cette optique, et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule chez l'Homme, des tests *in vivo* dans un modèle pertinent doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont en effet, à l'heure actuelle, indispensables pour compléter les données obtenues *in vitro*. Le Primate Non Humain (PNH) constitue un modèle pertinent, en raison de sa proximité phylogénétique et immunitaire avec l'Homme.

Ce projet sera divisé en deux procédures. Dans un premier temps, la mise au point d'un modèle de greffe de peau sera effectuée chez le PNH. Les greffes seront réalisées par paire d'animaux afin que les animaux donneurs et receveur soient deux individus distincts. Une paire d'animaux sera traitée avec une molécule immunosuppressive de référence et l'autre ne recevra aucun traitement (témoin). Ces données serviront de référence pour la deuxième procédure qui consistera en l'évaluation de l'efficacité immunosuppressive d'un nouvel anticorps dans le rejet de greffe de peau. De la même manière que la procédure 1, les animaux seront utilisés par paire afin de mettre en place le modèle de greffe, puis ils seront divisés en trois groupes : un groupe recevant le nouveau traitement immunosuppresseur, un groupe non traité (témoin) et un groupe traité avec la molécule de référence.

Pour ce projet, il est prévu d'utiliser 12 macaques cynomolgus par an, soit un total de 60 animaux sur 5 ans. Ces animaux seront tous issus d'un élevage agréé. Dans un souci de réduction, ce nombre a été réduit au minimum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme.

Un examen préliminaire par le vétérinaire sera réalisé pour juger de l'état de santé de l'animal avant toute procédure expérimentale. Un suivi individuel et biquotidien sera effectué tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider d'exclure l'animal de la procédure si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des volières conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal (SBEA) de l'installation, notamment la mise à disposition de jouets dans les hébergements (« kong », ballon, tube PVC...). Une rotation du matériel d'enrichissement, incluant une désinfection, sera organisée une fois par semaine pour éviter la lassitude et renouveler l'intérêt des animaux. Des friandises seront également distribuées systématiquement en fin de journée aux animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations. Si les animaux sont réutilisés de projets précédents, il sera veillé à ce que la gravité des procédures expérimentales ne dépasse pas le stade modéré.

7222. Le CD47 joue un rôle très important dans l'apoptose, la prolifération, l'adhésion, la migration, la réponse immunitaire et l'angiogenèse. Il est présent dans toutes les cellules humaines et surexprimé dans plusieurs types tumoraux. Cette surexpression permet aux cellules tumorales d'échapper à la phagocytose des macrophages et, partant, de ne pas être détruites. Elle favorise de plus le phénotype de cellule souche tumorale. Récemment, il a été décrit que l'expression de CD47 dans les cellules tumorales est identifiée par le système immunitaire comme un signal (« ne me mange pas ») et que le blocage de CD47 augmente la phagocytose des cellules tumorales dans des tumeurs solides et des tumeurs malignes hématologiques, et par conséquent, active le système immunitaire.

Notre travail se base sur l'hypothèse que les tumeurs évoluent et progressent d'une manière incontrôlée lorsque les réponses immunitaires anti-cancéreuses échouent. Une immunosurveillance naturelle influence clairement la progression du cancer du sein humain parce que le pronostic des patients est dicté par la densité, la composition et l'activité de l'infiltré immunitaire de la tumeur au moment du diagnostic.

De même, il a été prouvé que l'efficacité des agents anticancéreux classiques et ciblés n'est pas seulement due à des effets cytostatiques/cytotoxiques directs, mais repose également sur la (ré) activation des réponses immunitaires anti-tumorales ciblées. La chimiothérapie peut favoriser ces réponses en augmentant l'immunogénicité des cellules malignes, ou en inhibant les circuits immunosuppresseurs qui sont établis par le développement de néoplasmes.

Compte tenu de ces arguments, l'objectif principal de ce projet est de déterminer un éventuel rôle de CD47 dans le traitement du cancer du sein seul et/ou combiné avec des agents activant une mort cellulaire dite immunogène (ICD, de l'anglais « immunogenic cell death »).

Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement ; d'une part, ce projet nécessite l'implication d'animaux vivants et plus particulièrement de souris car un organisme vivant entièrement fonctionnel est indispensable du fait de l'étude de l'impact de l'immunité dans ces processus. Il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire ex-vivo du fait de sa complexité. Par ailleurs, le modèle de carcinogénèse étudié a été développé chez la souris pour permettre ce type d'étude.

D'autre part, le nombre d'animaux se justifie par la complexité du modèle et les différents groupes nécessaires pour montrer l'efficacité de notre hypothèse. Néanmoins, les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Le nombre d'animaux par groupe est de 12 ou 8, selon la procédure, et toutes les expériences seront effectuées au maximum 3 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. Ce projet nécessitera donc 1584 souris. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail.

De plus, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Si les souris sont faibles, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis, ainsi que des moyens supplémentaires pour maintenir la température corporelle.

7223. Le muscle strié adulte a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches. Ces précurseurs musculaires doivent développer des interactions spécifiques avec leur environnement pour assurer la réparation du muscle tout au long de la vie.

Notre projet vise à comprendre les rôles des cellules qui environnent les cellules souches musculaires et à identifier en quoi ces rôles sont altérés dans les pathologies musculaires. Ceci permettra l'établissement de nouvelles connaissances scientifiques, qui pourraient être utilisées dans la compréhension des pathologies du muscle squelettique. En effet, de nombreuses pathologies affectent le muscle, ainsi que le vieillissement ou un exercice physique trop intense.

Nos études utilisent de la culture cellulaire, à partir de cellules humaines, mais également de cellules murines, dont les modèles transgéniques permettent l'exploration du rôle de certains gènes. Ces expériences *in vitro* sont couplées à des expériences *in vivo*, nécessitant le recours aux animaux (souris). Si les interactions cellulaires peuvent être disséquées *in vitro*, il est indispensable de valider leur importance dans le remodelage tissulaire physiologique ou pathologique *in vivo*, à l'aide des modèles adéquats. C'est indispensable pour une approche physiologique intégrée et des essais à l'échelle préclinique d'activateurs/ inhibiteurs des voies moléculaires identifiées comme contrôlant ces interactions cellulaires.

Ce projet est divisé en 4 procédures et mobilisera 2557 souris, y compris les individus reproducteurs. Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux, remplacement : l'ensemble de l'équipe travaillant sur des sujets proches, les animaux sont "partagés" par plusieurs expérimentateurs. De plus, des banques biologiques issues des expérimentations sont gérées de façon commune afin d'y recourir et limiter l'utilisation de nouveaux animaux. Elles permettent notamment les études histologiques et les cultures cellulaires pour plusieurs analyses différentes. Autant que faire se peut, des prélèvements multiples sont réalisés après

euthanasie sur le même individu pour des tests parallèles. Les analyses statistiques précédentes de l'équipe permettent d'ajuster le nombre d'animaux requis au minimum. Les accouplements sont optimisés afin de produire le nombre nécessaire de souris. De plus, certains croisements engendrent des souris de génotype "inutile" (wild type) pour une lignée donnée : ces souris sont utilisées comme contrôles pour d'autres lignées, puisque la grande majorité de nos lignées ont le même fond génétique.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pendant et au décours des expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Enfin, le suivi de critères précis permettra de raffiner les protocoles et d'euthanasier rapidement les animaux présentant un phénotype dommageable.

7224. Des prélèvements, biopsies ou relevés de paramètres physiologiques sont ponctuellement nécessaires pour la mise au point de tests/calibrage d'appareils/choix de paramètres à inclure dans une étude avant sa planification et réalisation chez le primate non humain (PNH). Dans ce contexte, nous serons amenés à réaliser, chez un nombre restreint d'animaux, ces prélèvements/relevés nécessaires à l'évaluation de la pertinence des tests/études à réaliser. Ceci contribuera au raffinement des méthodes utilisées pour mener à bien les études et à réduire le nombre d'animaux utilisés dans les études si ces mises au point ne sont pas concluantes (renforcement de la règle des 3Rs).

Ce projet prévoit d'utiliser un maximum de 120 PNH sur 5 ans, qui proviendront d'un élevage agréé. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions (grille d'évaluation du bien-être animal, entraînements aux procédures avec récompense, limitation des prélèvements et volumes). Le personnel est entièrement formé. Les animaux seront sous la responsabilité du vétérinaire de l'installation.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long des procédures expérimentales (suivi clinique, poids, température) afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Un examen préliminaire par le vétérinaire sera réalisé pour juger de l'état de santé de l'animal avant toute procédure expérimentale. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de la procédure si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des conditions conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal de l'installation, notamment la mise à disposition de jouets dans les hébergements (« kong », ballon, tube PVC...). Une rotation du matériel d'enrichissement, incluant une désinfection, sera organisée une fois par semaine pour éviter la lassitude et renouveler l'intérêt des animaux. Des friandises seront également distribuées systématiquement en fin de journée aux animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

Si les animaux sont réutilisés de projets précédents, il sera veillé à ce que la gravité des procédures expérimentales ne dépasse pas le stade modéré.

7225. L'épigénétique a pour but de comprendre l'embryologie, les cellules souches, mais aussi le cancer et le vieillissement. Le corps humain (et celui des mammifères) comprend environ 400 types cellulaires différents avec des fonctions différentes (des cellules de muscles, de foie, de peau, des neurones, etc.). Toutes les cellules filles ont le même ADN que la cellule œuf d'origine mais l'utilisent différemment. Lors de la DIVISION cellulaire, les deux mètres d'ADN de la cellule sont dupliqués, enroulés dans les chromosomes, et déroulés ensuite ; la cellule mère donne deux cellules filles qui vont avoir le même ADN et l'utiliser de la même façon (une cellule de peau donne deux cellules de peau, etc). Lors de la DIFFERENCIATION cellulaire, au cours de l'embryogenèse par exemple, les cellules filles de la cellule œuf acquièrent progressivement de nouvelles propriétés. L'inverse est vrai dans le cancer où les cellules peuvent se différencier, régresser vers des propriétés plus proches des cellules souches, et en général, plus les cellules sont différenciées, plus le cancer est agressif.

Ce projet a pour objet deux gènes très semblables qui codent pour deux protéines impliquées dans le marquage de l'ADN au niveau des gènes actifs. La mutation de l'un de ces gènes est mortelle chez la souris au stade de l'embryon de quelques cellules. La mutation d'un gène déclenchée uniquement dans un tissu adulte n'a pratiquement pas d'effet décelable : il faut donc que les deux soient inactifs pour voir un effet dans des cellules adultes. Nous avons construit des souris génétiquement modifiées pour ces deux gènes à la fois et nous allons pouvoir provoquer la mutation dans l'épiderme de la souris. Le choix de la peau est dû au fait que (1) c'est un tissu où il y a en permanence DIVISION et DIFFERENCIATION des cellules (l'épiderme se renouvelle en permanence par multiplication de cellules qui se transforment ensuite et fabriquent différents types de kératine), (2) c'est un organe visible, c'est-à-dire que nous pourrions voir les effets de la mutation et agir au mieux pour limiter l'impact sur les animaux, et (3) enfin, c'est un tissu pour lequel il y a des modèles *in vitro* performants pour étudier la différenciation et poursuivre nos études.

REPLACER : les résultats déjà obtenus en culture cellulaire sur l'inactivation de ces deux gènes sont contradictoires, seuls les effets sur un tissu vivant permettront de valider les observations. Mais une fois ces observations faites, notre étude pourra se poursuivre par des études *in vitro*, en culture cellulaire, ou peau reconstruite, avec tous nos outils de biochimie et de biologie moléculaire.

REDUIRE : nous utiliserons un nombre minimum d'animaux vivants, nous prévoyons d'utiliser 150 animaux sur 3 ans, dont la moitié seront des contrôles qui ne devraient pas souffrir (ils n'auront pas la mutation complète).

RAFFINER : nous ne savons pas ce que va provoquer la mutation. La gravité maximale est donc SÉVÈRE. La simple logique veut que nous déclenchions une pathologie proche de l'épidermolyse bulleuse (formation d'ampoules suite au décollement de la peau).

Mais il est possible que la mutation empêche juste la cicatrisation de petites plaies cutanées ou la résistance aux rayons ionisants, ce que nous testerons aussi. Nous interviendrons par l'euthanasie des animaux avant que toute pathologie, quelle qu'elle soit, ne devienne grave, ou que des plaies s'infectent sans qu'on puisse les soigner. Une analyse histologique (des coupes histologiques de peau) sera notre observation clef au cours de ces expériences pilotes. Nos points limites seront alors réajustés pour minimiser la souffrance ou la gêne des animaux. Enfin, si les symptômes sont trop graves, nous pourrions restreindre le déclenchement de la mutation à une partie de la peau. (Des contraintes techniques nous empêchent de faire ainsi d'emblée). Nous utiliserons systématiquement des antalgiques dès l'apparition de symptômes pour couvrir la douleur qu'elle soit avérée ou éventuelle.

7226. Les patients traités par radiothérapie pelvienne peuvent développer des séquelles digestives liées à l'irradiation des tissus non tumoraux. Le but du projet est de comprendre le rôle du compartiment vasculaire dans l'initiation et le développement de ces lésions. Pour évaluer ces modifications dans les conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*. La lésion sera réalisée grâce à une irradiation localisée du colorectum ou de l'intestin grêle chez la souris préalablement anesthésiée. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études à visées précliniques. Ces modèles *in vivo* permettent de modéliser les lésions tissulaires observables chez l'homme. L'évaluation des paramètres physiologiques se feront sur des prélèvements réalisés sur des animaux anesthésiés avant euthanasie. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 790. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables.

7227. Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau à médiation immunitaire avec une incidence globale d'environ 2%, des comorbidités importantes, et un effet négatif important sur la qualité de vie des patients, leur bien-être et les interactions personnelles. Le psoriasis en plaques est la forme la plus fréquente, touchant 80% à 90% des patients atteints de psoriasis. La maladie commence habituellement à la fin de l'adolescence et l'âge adulte avec persévérance tout au long de la vie adulte. L'étendue de la zone affectée de la surface du corps et le degré de manifestations cutanées, notamment l'érythème, l'induration et la mise à l'échelle en 4 zones du corps, définissent la gravité du psoriasis. Environ 25% des patients présentent une forme modérée à sévère de la maladie.

Les agents biologiques ont transformé le traitement du psoriasis en ciblant sélectivement les molécules de signalisation immunitaire impliquées dans la pathogenèse du psoriasis. Bien que les produits biologiques offrent le traitement le plus efficace des formes modérées à sévères, ils ne sont pas sans complications. Certains patients traités par des produits biologiques ont des réponses cliniques pauvres, produisent des anticorps anti-drogue (ADA) ou développent des effets indésirables. En outre, il y a un besoin croissant de développer de nouvelles thérapies et d'évaluer les régimes de traitement, leur efficacité et leur sécurité.

Ce projet a pour objectifs : 1) le développement d'un modèle de psoriasis induit par une application journalière locale d'Imiquimod à 5% chez le macaque cynomolgus et 2) l'évaluation de nouvelles molécules thérapeutiques par leur caractère immunosuppresseur. Afin d'obtenir des données de reproductibilité et de valider ce modèle, tout en limitant le nombre d'animaux utilisés et au vu des perspectives thérapeutiques, il est prévu d'utiliser 100 macaques cynomolgus, tous issus d'un élevage agréé, sur la période de 5 ans couverte par ce projet.

Une observation du site d'application de la crème incluant une évaluation de l'érythème et de la desquamation ainsi que des biopsies cutanées et des prélèvements de sang de faible volume et peu fréquents permettront de mesurer la réaction immunitaire et de suivre son évolution chez le macaque.

Un examen préliminaire par le vétérinaire sera réalisé pour juger de l'état de santé de l'animal avant toute procédure expérimentale. Un suivi individuel et biquotidien sera effectué tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre les prélèvements. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de la procédure si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux dans des volières conformes aux recommandations et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal (SBEA) de l'installation, notamment la mise à disposition de jouets dans les hébergements (« kong », ballon, tube PVC...). Une rotation du matériel d'enrichissement, incluant une désinfection, sera organisée une fois par semaine pour éviter la lassitude et renouveler l'intérêt des animaux. Des friandises seront également distribuées systématiquement en fin de journée aux animaux. De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

Si les animaux sont réutilisés de projets précédents, il sera veillé à ce que la gravité des procédures expérimentales ne dépasse pas le stade modéré.

7228. L'utilisation de nanomatériaux manufacturés (MNMs) dans les aliments (additifs) et les emballages doit s'accroître considérablement dans l'avenir. Pourtant, leur toxicité après ingestion reste mal connue. Ainsi, l'évaluation de la sécurité des MNMs retrouvés dans l'alimentation est aujourd'hui une préoccupation majeure en Europe et dans le monde. Face à la multitude de MNMs potentiels, les données de toxicité sont encore insuffisantes et les résultats des études menées sont souvent contradictoires. En effet, pour une même espèce chimique de MNM, il existe une multitude de nanoparticules de propriétés physico-chimiques différentes (taille, morphologie, enrobage, ...). Ces propriétés physico-chimiques intrinsèques mais aussi l'état d'agglomération associés aux modifications provoquées par des processus physiologiques (comme la digestion) régulent probablement l'absorption et la toxicité



de ces matériaux. Ainsi, les capacités de solubilisation sont certainement déterminantes pour l'absorption des nanomatériaux et l'initiation de toxicité par des voies spécifiques. Il est donc important d'étudier le potentiel toxique des MNMs utilisés en agro-alimentaire. Dans ce projet, deux classes différentes de MNMs seront étudiées : le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) comme espèce insoluble et l'aluminium représentant une catégorie avec possibilité de solubilisation. Il est supposé que les nanoparticules d'aluminium forment des ions, avant ou pendant l'absorption intestinale, alors que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> traverseraient intactes la barrière intestinale. Cette différence de comportement pourrait souhaitons étudier la génotoxicité de ces MNMS. Des tests *in vitro* ont déjà été réalisés et nous voulons conforter les résultats obtenus *in vivo* après exposition orale. L'étude concernée par cette saisine s'intéresse à évaluer la génotoxicité sur des rats de deux formes de TiO<sub>2</sub> ainsi que des nanoparticules d'aluminium qui seront comparées à la forme ionique de l'aluminium. Les premières expériences sur animaux prévues dans ce projet scientifique nécessiteront 95 rats répartis en différents groupes de traitements par voie orale. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, nous réalisons plusieurs tests de toxicité simultanément et sur plusieurs organes à partir d'un même animal. Le bien-être des animaux est pris en compte en assurant des conditions d'hébergement en groupe avec l'adjonction de tubes dans les cages pour leur distraction. De plus, la prévention de la douleur est assurée par l'autorisation d'euthanasie en cas d'atteinte des points limites.

7229. L'un des développements les plus intéressants dans le domaine des thérapies est la production d'anticorps humains à partir de souris non transgéniques ou transgéniques « humanisées », pour les utiliser ensuite comme pistes de traitements dans de nombreuses indications cliniques. Les anticorps humains ont de multiples applications en recherche et en diagnostic, clinique humaine et animale, exploitant la reconnaissance de protéines en biologie.

Compte tenu de la complexité des anticorps, il n'existe pas de méthodes substitutives satisfaisantes à l'utilisation d'animaux permettant la production d'anticorps humains. Les anticorps ne peuvent en effet être produits qu'en présence d'un système immunitaire complet, ce qui est impossible à envisager sans une étape d'immunisation chez l'animal.

L'objectif de ce projet est de générer une large panoplie d'anticorps humains (banque d'anticorps), extraits des cellules lymphocytaires B de souris transgéniques, qui seront mis à disposition pour la production d'anticorps thérapeutiques dans les projets des différentes aires thérapeutiques. L'utilisation de souris non transgéniques est prévue pour garantir la spécificité « humaine » des anticorps produits.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact à l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux. Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal. Basés sur les standards de la littérature, les protocoles d'immunisation proposés utilisent un nombre réduit d'animaux, et pourront être améliorés suite à l'analyse des résultats. Un support en bio-statistiques est en effet apporté par des experts de la spécialité, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées, et de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire à la bonne réalisation des objectifs du projet.

1440 souris seront utilisées pour la mise en œuvre de ce projet.

7230 Il existe une multitude d'infection bactérienne ou virale qui induisent une baisse de rentabilité des élevages aviaires (diminution de la production d'œuf, hétérogénéité des lots entraînent un tri important en élevage ou un déclassement qui conduit à des saisies en abattoir voir une forte morbidité ou mortalité).

Afin de prévenir toute crise sanitaire voir une baisse de rentabilité des élevages, des protocoles de vaccination sont mis en place contre les principales causes d'infection aviaire : Influenza, Newcastle, Gumboro, Salmonelle...

Afin de permettre d'améliorer les protocoles de vaccination et de connaître les possibles interactions entre les différents protocoles de vaccination, des essais cliniques doivent être réalisés afin de caractériser la cinétique de répllication virale, d'explorer la diffusion du virus vaccinal mais aussi de comparer la protection entre différents protocoles de vaccination face à une épreuve infectieuse.

Ces études seront réalisées sur animaux vivants, car ce protocole de vaccination et d'essais d'immunogénicité du vaccin contre des infections virales vont faire intervenir le système immunitaire complet (réponses immunes humorales et cellulaires) et aucune méthode alternative n'est disponible à l'heure actuelle. Ces études vont nécessiter de travailler sur maximum 9000 volailles (poules pondeuses ou de chair), nombre maximal d'animaux envisagés sur plusieurs sessions étalées sur 5 ans. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des volailles, en limitant leur stress et en évitant de prolonger les souffrances induites par l'infection.

7231. La bonne réalisation d'un projet scientifique utilisant des animaux de laboratoire requière que le personnel appliquant les procédures expérimentales soit parfaitement formé aux gestes techniques nécessaires à l'atteinte des objectifs dudit projet. Cela passe obligatoirement par l'acquisition et le maintien du niveau de maîtrise de ces gestes, en particulier pour les nouveaux arrivants dans un établissement utilisateur (stagiaires, doctorants, post-doctorants, techniciens, chercheurs...). Ainsi, la bonne formation du personnel permet d'une part d'améliorer le bien-être des animaux en prévenant les gestes mal effectués et d'autre part d'éviter refaire des expérimentations en raison du manque de reproductibilité des résultats et donc de limiter le nombre d'animaux utilisés.

C'est par ailleurs une obligation réglementaire, pour un établissement utilisateur, de s'assurer de la bonne formation de son personnel et du maintien de ses compétences. Même si l'apprentissage de gestes techniques peut-être réalisé à l'extérieur de l'établissement dans le cadre de la formation continue, il est très rare que la personne formée applique directement les gestes appris dans un protocole complexe sans les revalider avant. Ceci nécessite donc d'utiliser des animaux de laboratoire dédiés à la formation et au maintien des compétences du personnel. Pour les gestes « courants », au lieu de les intégrer dans différents projets, il est plus judicieux de les

regrouper au sein d'un même projet supervisé par le responsable de la formation et du suivi des compétences qui permettra entre-autre de rationaliser le nombre d'animaux utilisés.

Dans ce cadre, les animaux ne recevront que du sérum physiologique (NaCl 0,9%) pour injection de manière à ce que la procédure expérimentale ne modifie que faiblement leur physiologie et permette ainsi de les réutiliser dans plusieurs procédures expérimentales, en respectant cependant un délai de récupération de 72 h minimum entre 2 procédures expérimentales. Cette formation se fera sur des rats (total de 300 individus mâles et femelles) et des souris (total de 100 individus mâles et femelles).

En résumé un tel projet permettra de renforcer la mise en œuvre de la règle des 3R dans l'établissement utilisateur :

-Réduction : diminution du nombre d'animaux utilisés dans les projets par 1) la rationalisation des animaux utilisés pour l'apprentissage des gestes techniques et 2) la diminution des erreurs expérimentales conduisant à refaire des expérimentations sur animaux ;

-Raffinement : amélioration du bien-être animal par la réalisation de gestes techniques dans le respect des bonnes pratiques avec utilisation de méthodes antalgiques si nécessaire ;

-Remplacement : difficilement applicable à ce projet puisqu'il vise à garantir le niveau de compétence du personnel dans la réalisation des gestes en expérimentation animale.

Ce projet s'adresse aux gestes couramment utilisés dans l'établissement utilisateur : gavage, injection intrapéritonéale, injection sous-cutanée, injection intramusculaire, injection intraveineuse, instillation intratrachéale, instillation intranasale, application cutanée et prélèvement de sang (veine caudale, aorte abdominale, intracardiaque).

7232. Introduction - Les éléments jouent un rôle crucial à l'état physiologique et de fines perturbations de leur distribution ou de leur quantité peuvent induire des pathologies. Récemment, il a été démontré que le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) jouent un rôle dans le développement tumoral. Plus particulièrement, une étude publiée dans la revue internationale Nature rapporte que le cuivre est nécessaire pour le développement des certaines tumeurs mutées. La distribution en éléments chimiques dans les tissus normaux versus tumoraux pourrait ainsi contribuer au diagnostic tumoral de mélanome ou à sa stadification. Dans ce contexte, l'imagerie élémentaire quantitative de l'ensemble du tissu contenant la tumeur revêt une importance fondamentale pour contribuer à mieux diagnostiquer ou classer les mélanomes et leur agressivité, ainsi que pour mieux définir les limites tumorales par rapport au tissu sain environnant.

Objectif - Analyser par imagerie élémentaire LIBS (« Laser induced breakdown spectroscopy ») de la répartition des éléments du tableau périodique sur différentes tumeurs mutées ou sauvage pour deux gènes, impliqués dans l'agressivité tumorale, afin de déterminer l'importance des différents éléments et leur répartition, au sein des tumeurs. Une première phase d'exploration chez l'animal permettra d'effectuer un screening des éléments d'intérêt (EOI) *in vivo*, avant de confirmer l'importance des EOI sélectionnés sur des mélanomes humains.

Méthodologie – Quatre lignées cellulaires de mélanomes seront implantées de façon sous-cutanée, sur les deux flancs, chez des souris NMRI Nude (n = 6 souris /lignée). Lorsque les tumeurs atteindront un volume d'environ 400mm<sup>3</sup>, les tumeurs seront réséquées, puis fixées et incluses en résine époxy. Les blocs tissulaires seront analysés au moyen de l'instrument LIBS afin de révéler la distribution et la concentration des EOI. Après analyse, des cartographies élémentaires quantitatives seront produites pour chacun des EOI par une méthode de traitement du signal originale et complexe. Afin d'effectuer ces tests, nous utiliserons donc 24 souris NMRI Nude. Sauf limites éthiques, les animaux seront euthanasiés le jour de la résection tumorale.

Résultats préliminaires - Une collaboration active a récemment démarré sur ce thème et a permis d'obtenir quelques résultats préliminaires encourageants. Parmi tous les éléments analysés, plusieurs sont répartis différemment entre tissu sain et tissu tumoral. Conséquences à long terme - Ce projet devrait permettre de (i) décrire pour la première fois la répartition des éléments chimiques dans des mélanomes de différents statuts mutationnels et de différents stades, (ii) mieux caractériser les marges tumorales dans le tissu sain, ou (iii) aider à mieux appréhender la tumorigénèse des mélanomes.

A ce stade du projet, il est indispensable d'intégrer le fait que les cellules se développent dans un organisme vivant. Le modèle murin nous semble le plus approprié, il permet de se rapprocher d'un grand nombre des caractéristiques de la pathologie humaine. Les souris immunodéprimées permettent le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les méthodes utilisées pour induire une tumeur sont rapides et reproductibles et la bonne connaissance de ce modèle de pathologie chez la souris fait que les limites éthiques de ce type d'expérimentation sont bien connues. Le degré de sévérité de cette expérimentation sera classé léger.

Les tests *in vitro* nous ont permis de réduire un maximum le nombre de lignées que nous souhaitons tester *in vivo*. De plus, l'approche statistique et l'expérience de l'équipe dans ce domaine, nous permet de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. Afin d'employer au mieux les animaux, le protocole présenté a été optimisé afin d'obtenir le maximum d'informations sans augmenter la douleur infligée aux animaux. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail.

7233. Le vieillissement de l'organisme résulte d'une perte progressive de la capacité à régénérer les tissus. Deux mécanismes essentiels participent à cette altération fonctionnelle, l'accumulation de cellules sénescents présentant une fonction délétère pour le microenvironnement tissulaire ainsi qu'une réduction du nombre de cellules souches adultes à la fonction altérée. Chez l'homme, il existe des mutations dans certains gènes provoquant des syndromes de vieillissement prématurés, modélisés chez la souris et récapitulant les différentes étapes du vieillissement physiologique de façon accélérée, qui nous serviront de modèle. Un certain nombre d'études indiquent que la circulation systémique, en lien direct avec l'ensemble des tissus de l'organisme pourrait avoir une influence considérable sur le maintien ou l'altération des fonctions tissulaires par l'intermédiaire de facteurs circulants restant à identifier. De façon intéressante, connecter le système circulatoire d'une souris jeune à une souris âgée, permet de restaurer des

fonctions altérées par l'âge comme la régénération musculaire, l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge, ou la perte de mémoire spatiale ou olfactive. Cependant, à ce jour, aucune expérimentation de ce type n'a été entreprise sur un modèle murin présentant un vieillissement accéléré et fera donc l'objet de notre étude. En conséquence, nous proposons un projet dont l'objectif principal est de préciser la nature et les effets de ces facteurs circulants. Pour cela nous allons utiliser un ensemble de modèles murins pertinents (n=4180) ainsi que plusieurs approches expérimentales très bien documentées par de nombreuses publications. La parabiose permet de connecter chirurgicalement le système circulatoire d'une souris âgée avec celui d'une jeune, et par des tests *in vivo* non invasifs nous visualiserons de potentiels effets positifs et/ou négatifs de cette circulation partagée sur certaines caractéristiques de la mobilité, de forces comportementales et métaboliques.

Tous les animaux seront traités avec considération en respectant le nombre d'animaux minimal et maximal par cage, en veillant sur leurs besoins vitaux quotidiens, en contribuant à leur bien-être (enrichissement) et pour ceux aux phénotypes handicapants, en mettant en place des procédures pour faciliter la prise d'eau et de nourriture (comme mettre de la nourriture en gel plus facile à atteindre et à manger), administrer si nécessaire des antibiotiques et/ou des antidouleurs. Afin d'éviter tout stress pendant les expérimentations, seule les personnes en charge du projet manipuleront ces animaux. Nous pensons que ce projet inédit contribuera non seulement à mieux comprendre les variations biologiques liées au vieillissement, mais aussi à élaborer des stratégies thérapeutiques innovantes visant à améliorer la physiologie tissulaire altérée avec l'âge et conduisant à l'établissement de pathologies chroniques.

7234. En Europe, le cancer du sein touche en moyenne 1 femme sur 8 et 15 à 20% de ces cancers développent des métastases à l'origine de tumeurs cérébrales. Le but de ce projet est de tester des marqueurs pour, dans un premier temps, diagnostiquer de façon très précoce une tumeur et, dans un deuxième temps, trouver une nouvelle voie de thérapie.

Les « Nanobodies », fragments des anticorps à chaînes lourdes de la famille des Camelidae (camélidés), possèdent les caractéristiques idéales pour agir comme marqueurs tumoraux. En effet, *in vivo*, ils se lient rapidement et avec une grande spécificité à leur cible après injection par voie intraveineuse. Il est souvent affirmé que plus petit est le traceur, plus profond et plus vite il pénètre dans le tissu tumoral. Toutefois, la preuve irréfutable que cela est vrai pour les nanobodies en comparaison aux anticorps monoclonaux n'a pas été apportée jusqu'à ce jour. En outre, la pénétration des nanobodies dans les tumeurs cérébrales n'a jamais été démontrée.

Dans ce contexte, nous proposons de réaliser deux expériences visant à étudier :

- l'effet de la taille des nanobodies sur la pénétration dans les tumeurs
- le ciblage de tumeurs cérébrales avec des nanobodies

Ces expériences seront réalisées en imagerie intravivale pour un suivi dynamique et longitudinal.

Il n'existe malheureusement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale pour répondre à ces objectifs impliquant une étude en cancérologie. Nous avons néanmoins effectué des calculs statistiques nous permettant de prédire le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir nos résultats, et tout est mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés à son minimum (64 souris). Les souris sont hébergées dans des milieux enrichis (copeaux pour créer des nids, abris, tunnels), et nos animaux sont suivis quotidiennement pour détecter tout symptôme inattendu, en minimiser les conséquences (administration de soins), et prévenir toute douleur ou souffrance. Le cas échéant, l'expérimentation serait immédiatement interrompue par une euthanasie compassionnelle (application de points limite).

7235. L'axe intestin-cerveau dans la sclérose en plaques : interactions entre les modifications de la perméabilité intestinale induites par le stress et la survenue de rechutes.

(Durée du projet : 5 ans)

But du projet : Recherche appliquée et translationnelle

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central. Il existe plusieurs formes de SEP : dans la majorité des cas, le décours de la maladie se distingue par la succession de périodes de poussées et de rémissions, de durée et de fréquence variables, correspondant à des cycles d'apparitions de symptômes et de récupération totale ou partielle. D'un point de vue physiopathologique, les cycles de poussées et rémissions correspondent à des phases de démyélinisation et de remyélinisation, associés à des statuts neuroinflammatoires différents. Deux millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde, dont 80.000 en France. L'apparition de la SEP se situe typiquement entre 20 et 40 ans. Elle constitue pour cette raison la deuxième cause d'handicap moteur du jeune adulte. Des études reportent que les stress aigus de la vie (divorce, difficultés au travail, déménagement, décès d'un proche, etc.) augmentent chez les patients atteints de SEP la probabilité de faire une poussée. Ces poussées sont souvent accompagnées de troubles intestinaux chez les patients. De récentes études montrent qu'un stress aigu chez la souris augmente la perméabilité intestinale. L'objectif principal du présent projet est de comprendre les liens entre les modifications de perméabilité intestinale induites par le stress aigu et l'apparition des poussées dans un modèle de SEP chez la souris.

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

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la sclérose en plaques. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant en partie les caractéristiques de la SEP : l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier la SEP. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale.

En s'appuyant sur nos précédents projets utilisant l'EAE et sur les données disponibles dans la littérature, nos estimations du nombre d'animaux utilisés sont faites de manière à réduire au maximum ce dernier. Ainsi, le nombre de 770 souris prévues dans le projet est le strict minimum nécessaire afin de bénéficier d'une puissance statistique suffisante, tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

Les souris sont suivies quotidiennement par un personnel qualifié. Plusieurs fois par jours, un contrôle du bien-être animal est réalisé sur l'ensemble des animaux utilisés dans ce projet. Tous les moyens pouvant contribuer à la diminution de la souffrance animale seront utilisés au cours de ce projet.

Mots clefs : sclérose en plaques, encéphalite auto-immune expérimentale, encéphalite allergique expérimentale, intestin, imagerie, comportement.

7236. La leucémie myéloïde aiguë est un cancer du sang. Cette maladie, différente d'un patient à l'autre, se caractérise par un envahissement de la moelle osseuse par des globules blancs immatures. Dans la majorité des cas (70 %), les patients rechutent suite aux traitements actuels basés essentiellement sur l'utilisation d'agents chimiques, indiquant que certaines cellules leucémiques n'ont pas été éradiquées. Cette chimiorésistance est en partie liée à l'adhérence des cellules à l'environnement de la moelle osseuse. Pour identifier les facteurs responsables de cette adhérence et découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques, nous avons développé des modèles de leucémie *in vivo* en injectant les cellules de ces patients à des souris immunodéficientes. Ces souris n'ont pas de système immunitaire et permettent le développement des cellules humaines. L'objectif de cette étude est d'identifier les facteurs du microenvironnement médullaire qui favorisent le développement des cellules leucémiques. Des études *in vivo* sont indispensables car, jusqu'à présent, l'hétérogénéité du microenvironnement de la moelle osseuse est impossible à reproduire en utilisant des systèmes de culture cellulaire. De plus, lors de l'injection des cellules dans la circulation sanguine, leur migration vers les organes et leur installation dans ces sites sont des processus multiparamétriques qui ne peuvent pas être reproduits *in vitro*. Il est donc indispensable que de telles études soient menées sur des animaux entiers. Ces études *in vivo* ne peuvent pas être remplacées par des systèmes *in vitro* car, jusqu'à présent, l'environnement de la moelle osseuse est mal connu et est difficile à reproduire. De plus, lors de leur injection dans la circulation sanguine, les cellules doivent migrer vers la moelle osseuse et s'y installer. Notre objectif est d'étudier les molécules d'adhérence qui permettent aux cellules leucémiques de migrer vers la moelle osseuse et de s'y maintenir. Pour cela nous évaluerons les effets d'inhibiteurs de l'adhérence sur la prolifération des cellules leucémiques. Les résultats obtenus pourront potentiellement avoir un impact sur le traitement des patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës.

Pour analyser le rôle de l'adhérence sur la prolifération des cellules leucémiques, nous avons réalisé des tests d'adhérence *in vitro* et sélectionné un nombre réduit de voies à tester *in vivo*. Ces tests ont permis de réduire le nombre d'animaux nécessaires. Les différentes procédures et traitements sont standardisés et optimisés permettant également une réduction du nombre d'animaux. Le nombre d'animaux utilisé a été calculé statistiquement afin d'être réduit à son minimum tout en préservant la validité statistique de l'étude et avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Le test de Student sera utilisé pour l'analyse statistique. Une valeur de  $p < 0,05$  sera considérée comme significative. Afin d'améliorer le bien-être des animaux, les cages sont enrichies avec des tubes en carton et des « cocoons ». Les procédures seront réalisées en utilisant l'anesthésie gazeuse. Les animaux seront suivis quotidiennement.

Après anesthésie des souris par isoflurane, les cellules leucémiques seront injectées dans le sang et leur nombre sera évalué une fois par semaine par prélèvement d'une goutte de sang. Les souris seront traitées avec des inhibiteurs de l'adhérence (chimiorésistance en partie due à l'adhérence des cellules dans l'environnement de la moelle osseuse). Cette étude nécessitera l'utilisation de 876 souris (durée 4 ans).

7237. Ce projet de recherche fondamentale, d'une durée de 6 mois, porte sur un de ces gènes dont des mutations ont récemment été identifiées chez des enfants atteints de troubles autistiques. Des modèles de souris mimant la mutation humaine ont été générés récemment. Les résultats préliminaires obtenus chez ces souris indiquent que la mutation génétique a plusieurs conséquences importantes sur l'anatomie cérébrale, dont une hydrocéphalie et une diminution de la taille de certaines régions du cerveau impliquées dans la mémoire et les comportements sociaux. L'objectif de cette étude sera d'obtenir une image de haute résolution et en trois dimensions de l'anatomie du cerveau chez la souris, afin de déterminer avec précision les conséquences de l'inactivation de ce gène sur le développement cérébral.

Bénéfices attendus du projet

Les troubles du neuro-développement tels que l'autisme, la schizophrénie, l'épilepsie ou le retard mental résultent en partie de perturbations dans les mécanismes impliqués dans le développement cérébral chez le fœtus et pendant la petite enfance. Des études récentes de l'analyse du génome humain ont permis d'identifier de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans ces maladies neuro-développementales. Cependant les conséquences de la mutation de ces gènes restent pour l'essentiel inconnues. Ce projet contribuera à une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la formation du cerveau chez le fœtus et le jeune enfant, et à une meilleure compréhension des causes génétiques des maladies du neuro-développement.

Espèce et nombre d'animaux prévus

L'étude sera conduite chez la souris car l'architecture du cerveau dans cette espèce est proche de l'architecture du cerveau humain, et en raison de la possibilité de mimer la mutation humaine grâce à un modèle déjà disponible. Le nombre d'animaux, déterminé grâce à un test préalable de puissance statistique, est estimé à 10 souris au total (5 souris mutantes et 5 souris non mutantes).

Effets néfastes attendus pour l'animal et application des 3R

Notre projet consiste en une expérience d'imagerie cérébrale, non invasive, et réalisée sous anesthésie générale. La procédure est non douloureuse et ne laisse pas de séquelle. A l'issue de la procédure, les animaux seront réintégrés à la colonie comme animaux reproducteurs.

Le recours à un modèle animal est une nécessité au regard des objectifs du projet, à savoir la caractérisation des perturbations de l'anatomie cérébrale consécutives à une mutation identifiée chez l'homme (l'anatomie cérébrale nécessitant par définition l'étude du cerveau, qui ne peut être reproduit *in vitro*). Le nombre d'animaux a été déterminé au préalable par un test de puissance statistique, permettant de réduire autant que possible le nombre d'animaux utilisés. Enfin bien que la procédure soit non invasive, le protocole expérimental sera raffiné par l'application systématique de mesures d'enrichissement de l'environnement des animaux et le recours systématique aux techniques d'anesthésie pour toute manipulation susceptible d'entraîner du stress ou de la douleur chez l'animal.  
Mots clés : cerveau – cortex – autisme – schizophrénie – Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

7238. La myopathie à némaline (NM), aussi appelée myopathie à bâtonnets, est une maladie héréditaire touchant les muscles qui est de sévérité variable. Cette pathologie, dont l'incidence dans la population est de 1/50 000, ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement et se traduit dans la majorité des cas par un décès à un âge précoce. Cette pathologie est due à des mutations localisées dans une dizaine de gènes, dont le gène codant pour la protéine :  $\alpha$ -actine squelettique (ACTA1).

A ce jour, aucun modèle cellulaire ne permet de reproduire l'ensemble du phénotype de la maladie et il est essentiel d'avoir un modèle physiologique pour mettre au point la stratégie de thérapie génique. Le modèle animal murin reproduit bien les différents aspects phénotypiques et permet d'étudier l'ensemble des mécanismes physiopathologiques (pas de remplacement possible). Notre projet vise à étudier une souche murine porteuse d'une mutation au niveau du gène de l' $\alpha$ -actine squelettique et de mettre au point une stratégie de thérapie génique pour la NM en utilisant des Virus Associés aux Adénovirus (AAV) afin d'apporter aux cellules musculaires, ayant une forme mutée de la protéine ACTA1, un ADN capable de synthétiser la forme non mutée de cette protéine. Pour étudier l'efficacité de cette stratégie de thérapie génique, l'utilisation de la lignée murine possédant le gène muté d'ACTA1 est nécessaire. Cette lignée reproduit les aspects cellulaires et phénotypiques de la maladie humaine avec fidélité (faiblesse musculaire, présence de bâtonnets de némaline dans les fibres musculaires).

Notre projet nécessite le maintien de cette lignée au sein de l'animalerie, elle nous servira pour l'étude de notre stratégie de thérapie génique pour la NM.

De surcroît, afin de prévenir tout risque d'inconfort, de douleur ou de détresse des souris, des indicateurs de douleur et de souffrance (raffinement) ont été clairement définis (perte de poids excessive, aspect général de l'animal) et sont maîtrisés par le personnel qualifié en charge de l'expérimentation animale. Par ailleurs, le raffinement sera mis en avant par l'utilisation d'une alimentation adaptée et enrichie pour pallier aux conséquences de la maladie chez l'animal (les souris malades ayant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de leur en faciliter l'accès), des espaces de nidification seront également aménagés dans les cages. Par ailleurs, les infections oculaires qui peuvent accompagner le phénotype des souris mutantes seront traitées avec une pommade oculaire d'antibiotiques.

Les procédures expérimentales prévues dans ce projet se limiteront au strict nécessaire afin d'atteindre des résultats scientifiquement et significativement valides (réduction). Pour garantir cela, des calculs statistiques ont été réalisés pour estimer le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

La durée du projet sera de 3 ans et il nécessitera l'utilisation totale de 720 souris.

7239. 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-dire 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 est donc une condition nécessaire pour des applications biomédicales appropriées.

Chez les animaux nocturnes, l'activité comportementale conduit à une suppression de l'activité électrique dans les noyaux suprachiasmatiques, siège de l'horloge principale des Mammifères, qui génèrent les rythmes circadiens. Le résultat de cette suppression est que l'amplitude du rythme activité électrique des noyaux suprachiasmatiques est renforcée par l'activité de comportements de l'animal nocturne pendant la phase du cycle lumière/obscurité où il est actif.

Toutefois, si les animaux diurnes répondent à l'activité comportementale par une suppression de l'activité électrique des noyaux suprachiasmatiques, comme le font les animaux nocturnes, l'effet serait une réduction, plutôt qu'une amplification de l'amplitude de l'horloge, étant donné que les animaux diurnes sont actifs pendant le pic de l'activité électrique de l'horloge.

Pour tester cette hypothèse, nous allons étudier un rongeur diurne, *Arvicanthis*. Plus précisément, nous allons enregistrer l'activité électrique dans les noyaux suprachiasmatiques chez des *Arvicanthis* exposés à 4 conditions différentes d'éclairage (pour modifier le fonctionnement de l'horloge suprachiasmatique). Nous nous attendons donc à ce que les effets de rétroaction de l'activité comportementale sur l'horloge principale soient opposés chez les espèces diurnes, c'est-à-dire qu'ils soient de nature excitatrice, plutôt qu'inhibitrice comme chez les rongeurs nocturnes.

Nous étudierons également la rétroaction du rythme de prise alimentaire et/ou de la restriction calorique sur l'horloge suprachiasmatique de ce rongeur diurne.

Enfin, nous déterminerons l'impact d'un régime gras et sucré sur les oscillations circadiennes chez un rongeur diurne. Ces résultats devraient avoir des applications biomédicales car le rongeur diurne, *Arvicanthis*, est un meilleur modèle animal des troubles circadiens de l'espèce humaine.

L'investigation du cycle veille-sommeil et de la glycémie nécessite l'utilisation de modèles animaux *in vivo*, ce qui exclut l'application stricte de la règle N°1 des 3 R (= Remplacer).

Pour garantir des résultats valides sur le plan statistique (avec un seuil de significativité à  $P < 0.05$ ), 6 animaux par traitement et par groupe seront systématiquement prévus. Ce nombre d'animaux est réduit à son minimum possible en suivant la règle N°2 des 3 R (= Réduire). L'ensemble de ce projet conduira à implication d'un total de 278 *arvicanthis* sur 5 ans (procédure 1 : 50 animaux, procédure 2 : 132 animaux ; procédure 3 : 96 animaux nourris avec un régime gras). Pour les 3 procédures, les études seront longitudinales, chaque animal étant son propre contrôle, ce qui permet de diminuer le nombre d'animaux impliqués. Pour le raffinement des conditions d'hébergement, les animaux seront gardés en cages individuelles pour enregistrer leurs rythmes journaliers individuels et car les mâles sont agressifs entre eux. Cependant, les cages seront ouvertes, de sorte que les animaux garderont des contacts olfactifs et auditifs avec leurs congénères maintenus dans la même pièce. De plus, chaque cage sera enrichie d'un bâton à ronger.

Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie générale ou locale selon besoin avec prise en charge péri- et post-opératoire de la douleur (traitement anesthésique locale et/ou analgésique).

7240. Dans les cas d'endophtalmie à *Staphylocoque doré*, le pronostic sur l'organe est très souvent engagé. Parmi ses très nombreux facteurs de virulence et au cours de précédentes recherches, nous avons pu mettre en évidence que les leucotoxines miment les signes cliniques d'une endophtalmie. Ces toxines ont maintes fois été reconnues comme des facteurs de virulence pro-inflammatoires pouvant conduire à la nécrose tissulaire pouvant affecter la peau, le poumon, le muscle, l'os.... *In vitro*, nous avons pu montrer que l'usage d'inhibiteurs spécifiques en intra-vitréen permettent d'inhiber complètement ces toxines, bien que leur cible cellulaire ne soit pas identifiée. Nous avons révélé que certaines de ces toxines ciblent des neurones centraux et périphériques. Dans le vitré, il n'y a pratiquement aucun leucocyte, par contre la rétine constitue un tissu neurosensoriel complexe, pouvant transmettre de nombreux signaux pour la neurotransmission, mais aussi pro-inflammatoires. Parmi les leucotoxines, la leucocidine de Pantone et Valentine est l'une des plus actives sur ce tissu. Nous émettons l'hypothèse et souhaitons vérifier que certaines cellules rétinienne sont la cible de la LPV et de la leucotoxine HlgC/B, qui partagent le même récepteur (celui de l'anaphylatoxine C5a). En fonction des atteintes, le développement de l'action toxique et inflammatoire, des cas de perte de vision sans lésion cliniquement observable et aussi les mécanismes, probablement en cascade, aboutissant à la perte d'étanchéité de la barrière hémato-rétinienne, pourraient être expliqués. Par cette étude, nous souhaitons pouvoir caractériser au niveau de la rétine de lapin : 1) le(s) type(s) cellulaire(s) cible(s) de la leucocidine de Pantone et Valentine, 2) identifier des cellules secondairement affectées ou recrutées par l'action de cette leucotoxine. Le projet sera mené en conformité avec les 3R : Réduire : Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum pour avoir des résultats statistiquement corrects. Le test statistique utilisé pour ce projet est une régression aux moindres carrés partiels. Remplacer : le travail effectué se fait sur la rétine qui est un tissu complexe donc difficilement remplaçable par une culture cellulaire et la culture des différentes variétés de cellules rétinienne en lignée n'existe pas (sauf cellules de Muller, qui cependant sont insensibles aux leucotoxines). Les cultures de cellules *ex vivo* sont très aléatoires pour l'instant encore et les lignées cellulaires sont inexistantes. Raffiner : Les lapins sont nourris *ad libitum* et on ajoute dans leur cage une mangeoire en cours d'expérience pour plus de confort. Au-delà des moyens antalgiques, des points limite seront appliqués pour éviter aux animaux toute souffrance importante inutile.

Le nombre de lapins est de 15 pour ce projet.

7241. Le contexte de notre étude est le développement de thérapies innovantes contre le cancer, en particulier les cancers résistants pour lesquels il n'existe pas de traitement efficace.

Dans ce cadre, l'objectif est de tester le potentiel de molécules à cibler les tumeurs.

Les molécules utilisées seront des polymères marqués avec un fluorophore.

Leur distribution sera suivie à l'aide d'un système d'imagerie optique de fluorescence du petit animal adapté pour une évaluation rapide et relativement peu onéreuse du niveau de fluorescence dans la souris.

Afin de déterminer le polymère ayant la meilleure bio-distribution et ciblant le mieux les tumeurs, 8 molécules différentes seront testées en faisant varier plusieurs paramètres :

- la forme (polymère linéaire- nanoparticule)
- le type de greffage du fluorophore
- la présence ou non de ligands spécifiques des tumeurs.

Leur pharmacocinétique et le ciblage tumoral passif ou actif seront ensuite évalués par imagerie de fluorescence non invasive.

Dans un second temps, la capacité de ces molécules à cibler l'angiogénèse sera évaluée.

10 souris par molécules pour la bio-distribution seront nécessaires, soit 80 souris. Puis 12 souris par groupe pour déterminer le ciblage de l'angiogénèse, soit 48 souris. Pour l'ensemble de cette étude, 128 souris seront nécessaires.

L'ensemble des molécules testées *in vivo* ont été préalablement testées et validées *in vitro* dans plusieurs modèles cellulaires. Seules les molécules ayant la meilleure capacité à cibler les cellules tumorales seront testées chez l'animal. Les modèles expérimentaux animaux, et en particulier les modèles murins, sont les plus adaptés à l'étude de la bio-distribution de molécules marquées avec un fluorophore par imagerie optique *in vivo*. Ces modèles permettent d'avancer dans la mise au point de nouvelles thérapies anti-

tumorales et procéder à leur évaluation préclinique avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme. Il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail.

Remplacer :

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

Réduire :

A partir d'un grand nombre de molécules synthétisées par une équipe avec laquelle nous collaborons, les tests *in vitro* nous ont permis de réduire un maximum le nombre de molécules que nous souhaitons tester *in vivo*. De plus, l'approche statistique et l'expérience de l'équipe dans ce domaine, nous permet de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables.

Raffiner :

Afin d'employer au mieux les animaux, le protocole présenté a été optimisé afin d'obtenir le maximum d'informations sans augmenter la douleur infligée aux animaux. Par ailleurs, des points limites seront appliqués.

7242. Alors qu'une exposition externe aux rayonnements ionisants irradie les tissus de manière relativement homogène, la situation est très souvent différente en cas de contamination interne par des nucléides radioactifs, rendant l'estimation de la dose reçue, même à l'échelle du tissu, très complexe. De même, l'évaluation des effets biologiques produits par une contamination interne est fortement limitée. En effet, les incertitudes quant à la localisation des radionucléides et au dépôt d'énergie associé entraînent de nombreuses complications pour l'analyse de biomarqueurs de doses. Ce déficit de connaissances existant sur la distribution de la dose suite à une contamination interne et sur les effets biologiques induits rend difficile la quantification du risque associé. Or, les besoins d'étude dans ce domaine sont de plus en plus grands, notamment en radioprotection suite aux accidents de Tchernobyl et de Fukushima mais aussi en médecine où l'utilisation croissante de radionucléides soulève des questions sur les effets au niveau des tissus sains. Des modèles animaux permettant d'estimer les dommages radio-induits à l'échelle des organes ou des principaux composants tissulaires sont donc indispensables pour aborder la problématique de la contamination interne. Plusieurs études *in vivo* – chez la souris – ont été réalisées par l'unité pour évaluer les effets biologiques de divers radionucléides (notamment le césium et le tritium) sur les lymphocytes du sang circulants, sur ceux de la rate, et sur divers tissus. Des effets biologiques, entre autres des dommages de l'ADN ont été observés pour la plupart à des très faibles doses après contamination interne. L'objectif de ce projet est d'établir des données complémentaires chez la souris après irradiation externe pour pouvoir analyser la relation-dose effet en termes de dommages de l'ADN pour des faibles doses de rayonnements gamma correspondant aux doses utilisées dans les études antérieures de contamination interne. La comparaison des effets biologiques induits, à doses équivalentes, après exposition interne vs externe permettra d'accroître les connaissances sur les effets biologiques et les risques associés après contamination interne.

Pour réaliser cette courbe dose-effet, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*. Dans le cas de ce projet le modèle animal choisi est la souris. Les animaux seront exposés à une irradiation externe à faible dose. Du sang, ainsi que des organes seront prélevés ; le sang sera prélevé sur animal anesthésié, les organes après euthanasie. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 100.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, la procédure expérimentale a été établie avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables.

7243. L'utilisation de nanomatériaux manufacturés (MNMs) dans les aliments (additifs) et les emballages doit s'accroître considérablement dans l'avenir. Pourtant, leur toxicité après ingestion reste mal connue. Ainsi, l'évaluation de la sécurité des MNMs retrouvés dans l'alimentation est aujourd'hui une préoccupation majeure en Europe et dans le monde. Face à la multitude de MNMs potentiels, les données de toxicité sont encore insuffisantes et les résultats des études menées sont souvent contradictoires. En effet une même espèce chimique de MNM peut posséder une multitude de propriétés physico-chimique, régulant probablement l'absorption et la toxicité de ces matériaux lors de la digestion, Ainsi, les capacités de solubilisation sont certainement déterminantes pour l'absorption des nanomatériaux et l'initiation de toxicité par des voies spécifiques. Il est donc important d'étudier le potentiel toxique des MNMs utilisés en agro-alimentaire. Dans ce projet, deux classes différentes de MNMs seront étudiées : le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) comme espèce insoluble et l'aluminium représentant une catégorie avec possibilité de solubilisation. Il est supposé que les nanoparticules d'aluminium forment des ions, avant ou pendant l'absorption intestinale, alors que les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> traverseraient intactes la barrière intestinale. Cette différence de comportement pourrait expliquer les différences d'organes cibles et de toxicité rapportées dans plusieurs publications. Dans ce contexte nous souhaitons étudier la toxicité de ces MNMS. Des tests *in vitro* ont déjà été réalisés et nous voulons conforter les résultats obtenus *in vivo* après exposition orale. L'étude concernée par cette saisine s'intéresse à évaluer la toxicité sur des rats de deux formes de TiO<sub>2</sub> ainsi que des nanoparticules d'aluminium qui seront comparées à la forme ionique de l'aluminium. Les premières expériences sur animaux prévues dans ce projet scientifique nécessiteront 228 rats répartis en différents groupes de traitements par voie orale. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, nous réalisons plusieurs tests de toxicité simultanément et sur plusieurs organes à partir d'un même animal. Le bien-être des animaux est pris en compte en assurant des conditions d'hébergement en groupe avec l'adjonction de tubes dans les cages pour leur distraction. De plus, la prévention de la douleur est assurée par l'autorisation d'euthanasie en cas d'atteinte des points limites.

7244. Rôle des neuropeptides RF-amides sur l'activité de reproduction chez le hamster syrien mâle et femelle

Chez les rongeurs comme le hamster syrien, l'activité de reproduction varie en fonction des saisons et donc de la durée du jour. Ainsi, le hamster est sexuellement actif en été où les jours sont longs (photopériode longue) et inactif en hiver où les jours sont courts (photopériode courte). Récemment, notre équipe a montré, chez le hamster syrien mâle placé en photopériode courte, que la diminution de certains neuropeptides (Kisspeptine et RFRP3) entraîne une inhibition de l'activité de reproduction qui peut être réactivée en injectant ces neuropeptides.

De plus, des études préliminaires de notre équipe indiquent que les mécanismes d'action de ces neuropeptides présentent des différences selon le sexe des animaux nous conduisant à mener des études également sur des hamsters syriens femelles.

Le but de ce projet est d'analyser les mécanismes qui sous-tendent les effets différentiels des neuropeptides (kisspeptine et RFRP-3) sur l'activité de reproduction des hamsters syriens mâles et femelles. Il s'agit de tester l'effet d'activateurs (agonistes) ou d'inhibiteurs (antagonistes) sélectifs des récepteurs à ces neuropeptides (récepteurs GPR54 et GPR147) et d'évaluer l'effet rétroactif de la mélatonine (hormone de la glande pinéale dont la production dépend de la photopériode) et des stéroïdes sexuels (dont la production dépend des saisons). Des ligands peptidergiques, molécules se liant aux récepteurs étudiés, seront administrés directement dans le cerveau car ils agissent sur le système nerveux central. Le rôle de la mélatonine sera évalué en analysant les récepteurs GPR54 et GPR147 chez des hamsters produisant ou non de la mélatonine. Le rôle des hormones sexuelles, connues pour agir rétroactivement sur les centres nerveux qui contrôlent la reproduction, sera évalué sur des hamsters castrés ou non.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche sur animal. En terme de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées car l'axe reproducteur comprend différents étages (hypothalamus, hypophyse, gonades). En termes de réduction, nous avons établi un nombre d'animaux à 8 par groupe expérimental pour obtenir des résultats statistiquement valides (Test ANOVA) et nous aurons besoin de 1208 mâles et 1208 femelles hamsters syriens au total sur 5 ans. En termes de raffinement, le milieu de vie des hamsters sera enrichi avec un nid et un barreau à ronger. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (injections dans le cerveau, castrations, ablation de la glande pinéale) 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, suivi du score de douleur).

7245. L'hypoxo-ischémie représente la cause majeure de troubles neuro-développementaux et d'incapacité physique chez l'enfant, allant jusqu'à la paralysie cérébrale (prévalence 2%). La paralysie cérébrale se caractérise par un ensemble de symptômes et déficits sensoriels, moteurs et cognitifs variables selon la lésion cérébrale, induite par un évènement hypoxo-ischémique autour de la naissance. Ces symptômes sont fortement corrélés avec une atteinte de la substance blanche. Un modèle animal de paralysie cérébrale basé sur l'ischémie prénatale et une restriction sensorimotrice (SMR) au cours du développement a été développé. Il a permis de mettre en évidence et de reproduire chez le rat adulte la diversité des symptômes majeurs observés chez les patients atteints de paralysie cérébrale. Aucune méthode non-animale ne permet cela à ce jour.

Le présent projet a pour objectif d'étudier les effets d'une ischémie périnatale et d'une SMR précoce sur le développement des troubles sensorimoteurs, dont la spasticité (co-contractions de muscles antagonistes et spasmes), et plus particulièrement sur les propriétés musculaires et sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces changements. Il vise également à développer un traitement basé sur l'administration d'érythropoïétine (EPO) pour guérir, ou au moins réduire, la spasticité. L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total de 360 rats. Ce nombre a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles). Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux.

Ces études permettront de développer de nouvelles stratégies de neuroprotection, de réhabilitation, par le biais notamment de traitements pharmacologiques, et de dépistage précoce de lésions cérébrales conduisant à la paralysie cérébrale, applicables à terme chez les femmes enceintes à risques.

7246. Les irradiateurs de précision dédiés aux petits animaux ont fait leur apparition il y a quelques années, afin de faciliter le transfert des études précliniques vers la recherche clinique. Un de ces systèmes (XRAD 225Cx, PXI) a été installé à Caen en octobre 2012 dans le cadre de l'équipex Rec-Hadron. Néanmoins, l'émergence de ces nouvelles techniques d'irradiation a fait apparaître le besoin de nouveaux outils et la mise en place de nouveaux protocoles afin de s'approcher au plus près des traitements les plus complexes pratiqués en radiothérapie clinique.

Notre équipe a, entre autres, travaillé sur la dosimétrie des petits champs à moyenne énergie ainsi que l'asservissement respiratoire (gating) de l'irradiation. Les premiers travaux ont été menés sur l'élaboration de fantômes afin d'optimiser les protocoles avant toute irradiation de modèles animaux. Néanmoins, la mise en œuvre de ces outils nécessite à présent une validation *in vivo* portant sur 15 rats et 10 souris. L'expérimentation portant sur des validations instrumentales et dosimétriques, elle ne nécessite pas d'intervention invasive sur les animaux.

En outre, les tests effectués au cours de cette étude permettront d'optimiser différents aspects de l'irradiation du petit animal lors de futures études.

Les procédures de ce projet consistent essentiellement en des acquisitions d'imagerie ainsi que des irradiations effectuées sous anesthésie. Chaque animal recevra plusieurs doses (dans la limite de 17.5 Gy) afin de limiter le nombre d'animaux utilisés.

7247. Chez l'homme 0,5% de la population est atteinte de mutations sur des gènes appelés CCM. Ces mutations provoquent des malformations des petits vaisseaux sanguins dans le cerveau. Ces malformations sont hémorragiques car les vaisseaux sont mal



formés avec notamment des défauts d'étanchéité de l'endothélium. Ces hémorragies endommagent le cerveau autour et provoquent des déficits fonctionnels pouvant aller jusqu'à la mort du patient. Il existe un modèle de souris génétiquement modifiées qui récapitule très fidèlement cette pathologie. C'est donc un très bon outil pour l'étude des causes de cette pathologie et des traitements possibles. De façon intéressante, des lésions vasculaires similaires à celles observées dans le cerveau sont présentes sur la rétine. L'œil est un organe accessible et sera donc utilisé dans ce projet pour tester une thérapie ciblée.

Nos recherches ont montré qu'un gène est très fortement exprimé au cours de la maladie. Nous chercherons à bloquer l'expression de ce gène par injection de petits ARN bloquants dans l'œil des souris mutées et nous chercherons à savoir si cela bloque la survenue ou l'expansion des lésions vasculaires rétinienne.

Ce projet portant sur l'étude de la réponse d'organe entier et de tissus complexes à des modifications génétiques durant la mise en place des vaisseaux, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire (qui a déjà servi à identifier les gènes intéressants) ou de simulation informatique. Le projet requerra l'utilisation de 400 souris maximum.

Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à ce que les résultats puissent être statistiquement représentatifs pour chaque expérience et permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. Le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser l'expérience sans compromettre les objectifs du projet sera ainsi utilisé.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance (notamment, suppression de la douleur grâce à l'administration d'antalgiques).

Les animaux utilisés pour ce projet sont nés et élevés en Europe. La prise en charge de la douleur induite est assurée par un suivi régulier des animaux et par l'anesthésie locale.

7248. Le taux de fer dans le sang chez l'homme est régulé par une hormone, l'hepcidine, qui est synthétisée par le foie. Les patients atteints de bêta-thalassémies, ont une déficience dans la synthèse de l'hémoglobine, ce qui entraîne une anémie et une surcharge en fer du fait des transfusions. De plus, pour compenser l'anémie, la synthèse de l'hémoglobine nécessitant du fer, l'organisme diminue l'expression de l'hepcidine. Ceci a pour conséquence d'augmenter le taux de fer dans le sang et d'accroître encore plus son accumulation anormale et d'exposer à des complications graves.

Nos résultats expérimentaux, obtenus, sur des souris normales ont montré que l'acide valproïque est une molécule capable d'augmenter l'expression de l'hepcidine et de réduire le fer dans le sérum saturation de la transferrine sanguine. Notre objectif est d'utiliser une situation physiologique au cours de laquelle l'hepcidine est basse en réaction à une carence en fer, afin d'apprécier si l'acide valproïque pourrait contrecarrer cette baisse d'hepcidine. Si l'hepcidine remontait, le traitement par l'acide valproïque pourrait alors être une aide thérapeutique chez les patients thalassémiques, qui ont une hepcidine basse, en limitant leur taux de fer dans le sang et les complications.

Afin de mimer l'hepcidino-déficience de la bêta-thalassémie, des souris âgées de 5 semaines seront soumises à un régime carencé en fer pendant 3 semaines. Ces souris diminueront leur niveau d'hepcidine comme dans les bêta-thalassémies, pour compenser la baisse de fer et tenter de maintenir le niveau de fer le plus normal possible. Les souris recevront alors une dose unique d'acide valproïque ou de son excipient par voie orale et nous évaluerons son effet sur l'expression de l'hepcidine et le fer sérique, 24, 48, 72 et 96h plus tard.

Ce protocole est prévu pour répondre à la règle des 3R. Réduire : le nombre d'animaux à un nombre minimal, permettant des études statistiques fiables, calculé ici à : i) 8 souris non carencées en fer qui nous permettront d'évaluer l'efficacité de la carence en fer sur l'hepcidine et le fer dans les groupes d'études qui sont carencés en fer au début du traitement, et ii) 64 souris répartis en 4 groupes de 8 souris carencées contrôles (excipient) et 4 groupes de 8 souris carencées traitées à l'acide valproïque, un groupe de chacune de ces deux conditions étant analysé à chacun des 4 temps. Le nombre total d'animaux est de 72. Raffinement : le protocole ne devrait pas entraîner de douleur significative. Des points limites sont toutefois définis et seront observés en cas d'évènement inattendu. Les animaux seront anesthésiés avant le prélèvement. Remplacer : l'étude fait suite à une expérimentation *in vitro* mais la saturation de la transferrine ne peut se doser que dans le sang. Le passage à un modèle pathologique intégré est nécessaire pour avoir une appréciation réelle de l'effet de l'acide valproïque dans des conditions d'utilisation réelles.

7249. Imager des cellules *in vivo* sans avoir recours à des biopsies est un des enjeux actuels de la médecine. Ainsi, dans un but applicatif d'imagerie chez l'homme, nous développons des agents contrastants et fluorescents ciblant des cellules humaines. Pour cela, nous allons chercher à imager des cellules humaines xénotransplantées chez la souris. Nous allons utiliser 60 souris, par groupe de 5. Des statistiques non paramétriques adaptées aux petits échantillons (n=5) seront réalisées (Mann-Whitney). Nous nous intéresserons à la variation du signal détecté en Imagerie par Résonance Magnétique et fluorescence. Lors de ces procédures, nous respecterons la règle des 3R. Remplacer : Après la phase d'optimisation *in vitro* en culture cellulaire, nous n'avons pas d'autre alternative pour étudier *in vivo* l'efficacité de l'agent de contraste ou fluorescent en système physiologique. Réduire : L'utilisation de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou de l'imagerie de fluorescence permet de réaliser un suivi longitudinal des mêmes animaux, et par là même de réduire le nombre total d'animaux. Raffiner : Toutes les procédures sont faites sous anesthésie afin de diminuer la souffrance animale.

7250. Un grand nombre de polluants chimiques sont connus pour déprimer le système immunitaire. Les études sur les capacités de défense immunitaire des premiers stades de vie de poisson sont encore rares. Afin d'évaluer de manière globale les effets d'une

contamination chimique sur les défenses immunitaires des premiers stades de vie, aucune méthode non animale étant disponible, un protocole de challenge immunitaire doit être développé puis testé sur embryons et larves de poissons médaka japonais. Ce protocole une fois validé sera mis en œuvre pour tester le potentiel immunotoxique de polluants environnementaux, notamment des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et des microplastiques. Dans ce projet, des essais associant des contaminations chimiques chroniques et des épreuves infectieuses à un virus (nodavirus) seront conduites sur 1500 poissons au stade embryonnaire et au stade de larves autonomes dans le strict respect de la règle des 3R. Les poissons seront exposés au produit chimique à tester par baignade ou contamination alimentaire avant d'être mis en présence du virus. L'effet du virus sur le comportement de nage et la survie du poisson sera suivi quotidiennement pendant 10 à 14j post-infection. Les animaux seront euthanasiés dès l'apparition des premiers signes cliniques de l'infection (nage désordonnée). Les données produites permettront à la fois de mieux connaître l'immunité innée chez les très jeunes stades de poisson mais aussi d'évaluer les effets immunotoxiques des polluants que l'on est susceptible de retrouver en milieu aquatique et leur seuil de toxicité.

7251. Le but du Diplôme d'université de microchirurgie est l'apprentissage de la suture vasculaire sous microscope opératoire chez le rat. Cet apprentissage est indispensable à de nombreuses spécialités chirurgicales travaillant sous microscope opératoire pour maîtriser des gestes uniquement réalisables sous microscope. Cette gestuelle est nécessaire en orthopédie comme par exemple pour la chirurgie de la main, en neurochirurgie, en ophtalmologie, en chirurgie plastique pour la suture vasculaire des lambeaux, en chirurgie vasculaire et cardiaque pour l'apprentissage de la suture vasculaire, pour la chirurgie viscérale et urologique notamment pour la réussite des sutures vasculaires des greffes de foie et de rein, etc.... Cet apprentissage doit se faire idéalement pendant l'internat de chirurgie ou au maximum en début de prise de fonction comme chirurgien.

Le nombre de rats pour la durée totale du projet sur 5 ans est de 785.

Dans le respect de la règle des 3R :

- Réduction : le nombre de rats inclus dans ce projet sera réduit au minimum. Au cours d'une séance, un rat sera mis à disposition de chaque participant pour s'entraîner. En raison de possibles décès prématurés de l'animal (des suites de l'anesthésie ou des manœuvres chirurgicales), il est prévu deux autres rats en tout pour l'ensemble des 12 participants, par séance.
- Remplacement : Les entraînements sur tubes de silicone permettent de limiter le recours aux animaux en début d'apprentissage
- Raffinement : Toutes les procédures seront supervisées par du personnel formé et compétent aux techniques expérimentales. En raison des interventions chirurgicales, l'évaluation et la prise en charge de la douleur seront particulièrement surveillées.

7252. Les maladies allergiques sont en constante augmentation dans les pays industrialisés au premier rang desquelles l'eczéma ou dermatite allergique de contact (DAC), qui touche 20% de la population dans les pays industrialisés. La principale cause en est l'exposition croissante et quotidienne des individus à des chimiques non protéiques appelés haptènes, présents dans l'alimentation ou l'environnement professionnel. Les haptènes entrent dans la composition de nombreux nutriments industriels (colorants, stabilisants, antioxydants...), les fragrances de parfums et certains métaux. Chez l'individu sain, de puissants mécanismes de régulation appelés 'tolérance orale' qui siègent dans l'intestin et le foie, permettent de contrôler les manifestations allergiques consécutives à l'absorption d'allergènes alimentaires (protéines, haptènes). La tolérance orale peut être induite chez la souris dans le modèle de DAC par administration orale de l'haptène avant l'exposition cutanée ce qui entraîne une prévention de la réaction allergique.

S'il est admis aujourd'hui que la flore commensale joue un rôle essentiel dans les processus de régulation du système immunitaire, il existe en revanche, peu d'information concernant l'implication du microbiote dans la tolérance orale.

La tolérance orale dépend de la flore et du récepteur Toll-like-4 (TLR-4), récepteur capable de lier le lipopolysaccharide (LPS) du microbiote, suggérant l'implication de LPS dans la tolérance orale. L'objectif de notre projet est de tester cette hypothèse en explorant d'une part l'effet de la déplétion transitoire de la flore par antibiothérapie sur l'induction de la tolérance orale dans le modèle de DAC, en précisant l'impact de ces traitements sur la perméabilité intestinale et l'intégrité de la barrière épithéliale. D'autre part, nous analyserons la restauration éventuelle de la tolérance orale par adjonction de ligands de TLR4 au traitement antibiotique. Le modèle de DAC chez la souris est choisi car i) c'est un modèle préclinique de référence, largement utilisé par les laboratoires de recherche académiques et l'industrie pharmaceutique, ii) il reproduit la physiopathologie de la DAC chez l'homme et iii) l'induction de tolérance orale par gavage avec l'agent sensibilisant bloque complètement la DAC de manière reproductible et efficace. Les études *in vivo* proposées sont indispensables pour répondre à la question, compte tenu de la complexité des mécanismes en jeu dans la tolérance orale, qu'il est impossible de reproduire dans des tests *in vitro*. Le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire permettant l'interprétation statistique des résultats. Les conditions d'élevage, d'hébergement et de soin ainsi que les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire au maximum toute douleur, souffrance ou stress des animaux. En termes de retombées attendues, ce projet devrait permettre d'identifier le rôle pro-tolérigène du microbiote et en particulier du LPS et de ce fait de déboucher sur des stratégies d'immuno-modulation et de biothérapies de l'allergie chez l'homme.

Le projet proposé sera conduit sur un total de 428 souris.

7253. Nos modes de vie (diagnostics médicaux) certains contextes professionnels (personnel navigant) et la survenue d'événements exceptionnels, tels que des accidents nucléaires ou des attaques terroristes radiologiques, représentent un risque pour les populations exposées aux rayonnements ionisants (RI) qu'il est important d'évaluer. Le nombre d'études épidémiologiques évaluant les effets radio cérébraux successivement à son exposition à des doses de RI inférieures ou égales à 1 Gy est extrêmement restreint. Certaines d'entre elles suggèrent malgré tout qu'une exposition externe aux RI, au cours du développement embryonnaire ou pendant

l'enfance, pourrait entraîner l'apparition de troubles cognitifs persistants à long terme chez l'Homme. Ce domaine d'étude a été très peu investigué par la communauté scientifique. Le but de cette étude expérimentale est d'améliorer nos connaissances scientifiques sur les troubles cognitifs susceptibles de survenir suite à une exposition externe du cerveau à des doses de RI comprises entre 0,1 et 1 Gy.

Dans ce projet, les conséquences de l'exposition aux RI du cerveau mais aussi de l'irradiation stéréotaxique d'une structure cérébrale seront donc étudiées. Ainsi, par la comparaison de deux modèles d'exposition (champ large du cerveau vs irradiation stéréotaxique d'une structure cérébrale), le rôle spécifique d'une structure cérébrale, et de son potentiel dysfonctionnement induit par l'irradiation, dans l'apparition de troubles cognitifs pourra être évalué après irradiation. Puis, au niveau de la structure cérébrale considérée, les altérations moléculaires, cellulaires et fonctionnelles radio-induites, sous-tendant l'apparition des troubles cognitifs radio-induits potentiellement observés pourront être décryptés. Les doses d'exposition faibles et modérées utilisées dans cette étude expérimentale ne doivent pas engendrer de souffrance chez les animaux. Ils seront malgré tout observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être.

Pour la réalisation de cette étude 799 souris mâles âgées de 10 jours ou 21 jours (si la réalisation de l'irradiation stéréotaxique est possible à l'âge de 10 jours, ce temps d'étude sera préféré à celui de 21 jours) seront utilisées sur une période de 5 ans. L'utilisation d'animaux est indispensable à la mise en place de tests comportementaux permettant d'étudier les fonctions cognitives. L'approche expérimentale que nous souhaitons mettre en place nécessitera certes pour chaque dose d'irradiation l'utilisation de deux groupes d'animaux (champ large du cerveau vs irradiation stéréotaxique d'une structure cérébrale). Cependant cette approche innovante permettra de prendre en considération le fonctionnement intégré du cerveau dans l'apparition de ces troubles et de répondre à des questions scientifiques non résolues quant aux mécanismes biologiques les sous-tendant. Afin de répondre au type de questions scientifiques soulevées dans ce projet, il n'existe pas de test *in vitro* substitutif. Dans l'objectif de répondre à l'exigence des 3R nous choisirons pour chaque expérimentation un nombre d'animaux permettant d'avoir une bonne puissance statistique pour obtenir des résultats scientifiques robustes sans avoir à effectuer de nouvelles expérimentations.

7254. Les blessures ne guérissent pas toujours ce qui représente un problème de santé majeur. De plus, les traitements actuels sont difficiles, coûteux, et les traitements basés sur des cellules ou des facteurs de croissance ne sont pas encore très efficaces. Nous avons développé une nouvelle stratégie qui consiste à traiter la matrice de la plaie avec des biopolymères conçus pour imiter les sulfates d'héparane appelé ReGenerating Agents (RGTA®).

Les principales macromolécules retrouvées dans la matrice extracellulaire (MEC) sont des polysaccharides ou glycosaminoglycanes (GAGs) qui peuvent se lier à un noyau protéique pour former des protéoglycanes. Certains polymères modifiés du glucose, ont la capacité de mimer l'action de certains GAGs de la MEC, les héparanes sulfates HS (les HS-mimétiques ou RGTA®), tout en étant résistants à la dégradation enzymatique. De nombreuses études ont montré leur implication dans les phénomènes de remodelage matriciel et de cicatrisation en stabilisant et protégeant les composantes de la matrice et les facteurs de croissance associés ainsi que leurs effets bénéfiques sur la néo-vascularisation, l'inflammation et la re-épithélialisation.

Dans cette étude, nous souhaitons évaluer l'efficacité induite par ce type de molécules dans différentes formulations dermatologiques soit par voie topique (de type crème, et en solution saline) soit de type injectable (en solution saline) dans deux types de modèles d'ulcère cutané.

1. Le premier modèle d'ulcère cutané nécrotique est mis au point, bien caractérisé et actuellement pratiqué au laboratoire. Les deux modes de formulations seront testés sur des souris mâles Swiss entre 6-12 semaines. Cette étude comprendra :

10 animaux par groupe, 6 groupes (contrôles négatifs (x2), RGTA® et ajustement de la dose (x4)), 6 types des RGTA® par an, 5 ans.

= 60 x 6 x 5 = 1800 souris

2. Le deuxième modèle est un modèle de contention de la plaie chez la souris. Notre étude sera réalisée sur des souris mâles C57/BL6 de 8 semaines. Une première expérience comprendra :

Expérience préliminaire : 5 animaux par groupe, 6 groupes (contrôle négatif et escalade de doses dans une fenêtre thérapeutique) = 30 souris

Cette première expérience sera réalisée afin de valider le modèle au sein du laboratoire et en cas de réussite, ce modèle sera privilégié pour tester le pouvoir de cicatrisation de composés actuels et futurs.

Pour ce modèle, notre étude sera réalisée sur des souris mâles C57/BL6 de 8 semaines. Cette étude comprendra :

5 animaux par groupe, 6 groupes (contrôle négatif (x2), RGTA® et ajustement de la dose (x4)), 6 formulations des RGTA® par an, 5 ans.

= 30 x 6 x 5 = 900

Cette expérience étant reproductible, seuls 5 animaux sont prévus par condition et des points limites à l'expérimentation (souffrance, infection...) ont été définis pour cette procédure.

Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet est :

Modèle d'ulcère cutané nécrotique : 1800 souris Swiss

Modèle cutané de contention de la plaie : 930 souris C57/BL6

Total : 2730 animaux

Il convient de noter que si le modèle de contention de la plaie est un succès, nous n'aurons pas besoin d'utiliser le modèle d'ulcère cutané nécrotique (1800 animaux).

Ces résultats nous permettront d'évaluer l'effet cicatrisant de nouvelles formulations innovantes et en cas de résultats probants, donnera lieu au développement de nouvelles formulations et indications thérapeutiques.

Pour cette étude, nous respecterons au mieux la règle des 3R :

Remplacement : bien que l'activité de liaison de RGTA® puisse être testée *in vitro* en utilisant des tests ELISA, à ce jour, la mesure de son activité biologique sur la cicatrisation (nécessaire pour les données précliniques afin de tester l'efficacité suivant ce mode d'administration) nécessite l'utilisation de modèles animaux.

Réduction : Dans notre étude, nous testerons un nouveau modèle de plaie de la peau (modèle de contention de la plaie) qui nécessite moins d'animaux (5 au lieu de 10 par condition). Si ce modèle est un succès, nous n'aurons plus besoin d'utiliser le modèle de l'ulcère nécrotique, réduisant ainsi le nombre total d'animaux nécessaires pour les essais futurs de RGTA®.

Raffinement : dans le modèle de contention de la plaie, une médication antidouleur post-opératoire est administrée aux animaux tous les jours (Carprofen 5mg/kg en sous-cutané) afin de réduire la souffrance des animaux après l'acte chirurgical. De plus, les souris seront mises en cage individuellement pour éviter la mastication des plaies et des bandages

7255. Les poissons sont soumis de plus en plus fréquemment à des variations spatio-temporelles de paramètres abiotiques dans les environnements estuariens et côtiers. Parmi ces paramètres, la température et la concentration en oxygène dissous présentent des fluctuations de plus en plus marquées. Certains organismes peuvent échapper à ces contraintes environnementales par migration ou dispersion. D'autres, présentant des capacités de nage plus réduites, doivent mettre en œuvre des régulations physiologiques pour leur permettre de s'adapter et survivre. C'est notamment le cas des larves de poissons marins qui sont susceptibles d'être présentes dans les nourriceries côtières en fin de phase de développement. Il est aujourd'hui bien établi que les régulations mises en œuvre par les organismes pour faire face à leur environnement durant les jeunes stades de vie peuvent imprégner leur fonctionnement physiologique sur le long terme. Si de nombreuses informations relatives aux conditionnements précoces sont disponibles dans le domaine médical, les connaissances de ces effets chez les organismes marins dans un contexte écologique sont encore très fragmentaires.

Dans ce contexte, le projet propose de conditionner des larves de bar Européen à des environnements combinant deux conditions d'oxygénation (40% et 100% de saturation) et de thermie (15 et 20°C) en fin de développement larvaire. Ces paramètres miment les conditions environnementales susceptibles d'être rencontrées par les larves dans les estuaires. L'objectif est de déterminer comment ces conditionnements précoces à des contraintes environnementales somme toute modérées programment physiologiquement les poissons sur le long terme. Le diagnostic des états physiologiques des poissons issus de ces conditionnements sera établi plusieurs mois après afin d'appréhender une éventuelle empreinte physiologique. La caractérisation de l'état physiologique des poissons sera effectuée dans différentes conditions environnementales, notamment celles que les poissons ont connues pendant leur jeune stade. Des paramètres intégrateurs de l'état physiologique des poissons seront régulièrement évalués (croissance, prise alimentaire, comportement dans le bassin). Une attention particulière sera portée sur les capacités d'extraction et de transport de l'oxygène. Pour ce faire, des analyses biochimiques et moléculaires contribueront à mieux caractériser les phénotypes des poissons et à comprendre les processus biologiques impactés.

Les nombres de larves mis en expérience (36000) et de juvéniles caractérisés physiologiquement seront déterminés au minimum (Réduire) en tenant compte des contraintes zootechniques telles que la densité minimale d'animaux requise pour ne pas induire de perturbations physiologiques et permettre une croissance et un développement harmonieux des poissons (Raffiner). Des protocoles d'anesthésie ou de sédation seront aussi pratiqués avant les prélèvements ou toutes manipulations des poissons (Raffiner). Le nombre de bacs utilisés et de poissons prélevés seront déterminés au minimum tout en permettant une analyse statistique suffisamment robuste (au regard des précédentes expériences). Le caractère intégrateur des performances physiologiques appréhendées dans le projet ne permet pas le remplacement des poissons par des approches *in vitro*.

7256. Le trait drépanocytaire est une forme bénigne de la drépanocytose, une maladie du sang. Le trait drépanocytaire est très fréquent dans les populations d'Afrique de l'Ouest et Afro-Caribéenne. Les maladies métaboliques, surtout le diabète de type 2, sont aussi très fréquentes dans ces populations. Ainsi, un nombre important et croissant d'individus est susceptible d'être à la fois porteur du trait drépanocytaire et diabétique de type 2. Bien que le trait drépanocytaire soit généralement considéré comme asymptotique, nous avons récemment observé des problèmes dans le fonctionnement des vaisseaux sanguins plus importants chez les patients diabétiques lorsqu'ils sont porteurs de cette mutation génétique par rapport à des diabétiques non porteurs du trait drépanocytaire. Les causes et mécanismes de ces altérations du fonctionnement des vaisseaux sanguins plus marquées chez les diabétiques porteurs du trait drépanocytaire sont inconnus. Le premier objectif de cette étude est de déterminer les causes et les mécanismes impliqués dans ces problèmes vasculaires. Des souris porteuses du trait drépanocytaire rendues diabétique par un régime obésogène seront utilisées afin d'étudier la fonction vasculaire *in-vivo* et *ex-vivo*. Les atteintes multiples concernant cette double pathologie ainsi que nos objectifs (analyses des problèmes dans les organes) ne nous permettent pas d'envisager de réaliser nos études sur des cellules en tubes à essai. Les résultats issus de ces études permettront d'approfondir les connaissances sur cette double pathologie et pourrait aboutir à des nouvelles voies de traitement permettant de retarder le plus possible la survenue de complications cardiovasculaires.

Trois-cent-quatre-vingt-dix-huit souris seront incluses dans ce projet. La moitié des souris seront porteuses du trait drépanocytaire et l'autre moitié ne sera pas porteuse du trait drépanocytaire, mais toutes les souris seront asymptotiques. Le régime obésogène provoquera une augmentation du sucre dans le sang (hyperglycémie) chez les souris. Toutes les souris seront mises à mort sous anesthésie générale à l'issue de chaque étude (selon une méthode réglementaire). La règle des 3R a été appliquée à ce projet : concernant le « Remplacement », le diabète et le trait drépanocytaire sont des maladies qui affectent plusieurs organes. De plus l'objectif principal de l'étude est de mesurer le fonctionnement des vaisseaux sanguins, rendant l'étude sur cellules isolées impossible et trop éloignée de la réalité. Nous avons « Réduit » au maximum le nombre d'animaux à inclure, en se basant sur notre expérience dans ce type d'étude. Nous avons de plus effectué des tests de puissance statistique appropriés pour calculer le nombre minimum d'animaux nécessaire. Le « Raffinement » a enfin été optimisé : les souris porteuses du trait drépanocytaire que nous

utilisons ont été créées pour mimer fidèlement la maladie présente chez les patients humains. En plus, le régime obésogène est validé chez les souris et ne cause pas de douleur. Les souris seront logées dans un environnement protégé pour limiter les risques d'infection. Leur litière sera changée régulièrement et elles auront de l'eau et de la nourriture à disposition. Si les souris contractent une infection ou si elles montrent de quelconques signes de souffrance, elles seront mises à mort.

7257. L'agent cytotoxique idéal doit être simple à manipuler et doit pouvoir détruire les cellules cancéreuses tout en épargnant les cellules saines de l'organisme. Cependant, du fait de leur manque d'action spécifique, les molécules actuellement utilisées en clinique doivent être administrées à des doses relativement élevées pour présenter un effet cytotoxique alors qu'elles possèdent des marges thérapeutiques étroites. Ceci est source d'effets indésirables sévères. Par ailleurs, les agents cytotoxiques en cours de développement présentent pour la plupart une solubilité aqueuse faible qui complique leur utilisation, limite leur biodisponibilité et in fine, leur efficacité thérapeutique.

Les nanotechnologies (nanomédicaments) peuvent être utilisées comme vecteurs de substances actives pour augmenter leur solubilité apparente, limiter les phénomènes de dégradation, les aider à passer les obstacles physiques tels que les membranes et les guider jusqu'à leur cible biologique.

Récemment, nous avons développé un procédé de formulation par émulsification spontanée qui permet l'obtention de nanoémulsions biocompatibles et polyvalentes. Elles permettent l'encapsulation de substances actives aux propriétés physico-chimiques différentes utilisables par différentes voies d'administrations. Cet outil est particulièrement prometteur car les études préalables montrent que ce système est stable dans des conditions mimant une administration par gavage ou intraveineuse, qu'il est non toxique *in vitro* et *in vivo* chez la souris et qu'il permet d'accroître significativement la solubilité du Pyridoclast, un nouvel inhibiteur de Mcl-1 (protéine anti apoptotique) qui doit faire l'objet d'une validation de son intérêt *in vivo*.

La faible solubilité du Pyridoclast peut entraver sa bio-distribution et son efficacité. Pour remédier à cet écueil, la synthèse d'un chlorhydrate du Pyridoclast a été réalisée. Ce composé présente certes une solubilité augmentée mais par rapport aux bases, les sels développent souvent des propriétés physicochimiques défavorables qui dans la majorité des cas empêchent leur développement comme médicament.

Dans ces conditions, il peut être plus avantageux d'avoir recours à des outils nanotechnologiques et chercher à les développer le plus tôt possible au cours du travail de « drug discovery » ou développement de médicaments. Après avoir confirmé la stabilité de notre système de vectorisation en milieu biomimétique, ce projet a pour objectif de déterminer les propriétés pharmacocinétiques du Pyridoclast encapsulé versus le sel de Pyridoclast chez la souris NMRI femelles adultes (n=360). Même si le passage à l'animal est nécessaire pour répondre aux questions scientifiques posées par ce projet, un soin particulier a été porté au respect du principe de la loi des 3Rs ; notamment par l'utilisation d'une méthode *in vitro* biomimétique (Remplacement), par l'utilisation d'un minimum optimal d'animaux utilisés pour satisfaire aux exigences statistiques et répondre à l'objectif du projet (Réduction) et par l'utilisation de méthodes limitant la souffrance des animaux (Raffinement).

L'enjeu scientifique et médical de ce programme de recherche est à la hauteur du risque encouru : l'identification d'un système efficace de distribution d'un agent anti-cancéreux.

7258. Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'AVC est souvent responsable de séquelles qui affectent la qualité de vie des patients. Les atteintes peuvent être motrices, sensitives, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire). En outre, les dépressions sont fréquentes. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. L'AVC fait donc l'objet de travaux de recherche afin d'évaluer les thérapies potentielles permettant d'en diminuer les conséquences. La complexité des mécanismes physiopathologiques liés à l'AVC ne permettant pas les études *in silico*, ces expériences ne peuvent à l'heure actuelle être réalisées que par l'intermédiaire de modèles animaux. L'objet de cette procédure est de présenter la technique d'induction de l'AVC par la méthode du filament ainsi que les expérimentations permettant d'évaluer les conséquences de l'AVC aux étudiants dans le cadre de stages au laboratoire et à des chercheurs d'autres équipes dans le cadre d'apprentissage à de nouvelles techniques. La méthode choisie pour l'induction de l'AVC est la méthode dite du filament qui présente l'avantage d'être reproductible, de nécessiter une chirurgie à minima, de reproduire des ischémies avec reperfusion et d'être réalisable chez la souris et le rat. Notre laboratoire possède une expérience de ce modèle d'AVC chez la souris, qui a fait l'objet de plusieurs publications internationales et est reconnu par la communauté scientifique. Les essais réalisés dans le cadre de cette formation seront menés en accord avec la règle des 3R. Ainsi, l'effectif sera limité à 30 animaux/an (soit 150 animaux sur 5 ans), considérant qu'il nous faudra former en moyenne 6 étudiants/an et qu'un minimum de 5 souris est nécessaire pour l'apprentissage de la technique. Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ainsi, après chaque chirurgie, les souris recevront une injection sous cutanée d'un antalgique opiacé et seront placées sur une couverture chauffante jusqu'à leur réveil. L'administration de l'antalgique sera répétée 6 à 8 heures après la première administration si les animaux montrent des signes de douleurs. La plus grande attention sera portée afin d'éviter la survenue de douleurs et de stress chez les animaux tout au long du protocole. Ainsi, après chaque chirurgie, l'état général des souris sera surveillé par une pesée (journalière dans la semaine post-chirurgie puis semi-hebdomadaire) et la recherche de signes de souffrance (observation visuelle, sept jours sur sept).

7259. Le requin-taube (*Lamna nasus*) est présent dans l'Atlantique Nord-Est, mais sa biologie et son écologie sont mal connues, notamment en raison de sa distribution largement océanique. Plusieurs populations autonomes pourraient exister. Afin de le démontrer et aussi de pouvoir faire un diagnostic sur l'état de la population présente au printemps et en été dans l'ouest de l'Europe, des campagnes en mer sont envisagées de 2016 à 2019. Elles permettront des poses de balises satellites afin de suivre le parcours des requins sur une année et ainsi de vérifier l'autonomie de la population ciblée par les campagnes.

L'objectif est de poser 38 balises en 2016-2017, ce qui correspond au strict minimum nécessaire pour l'obtention des résultats visés. Le nombre de poses pourra être augmenté si les financements le permettent, mais probablement pas au-delà de 70, avec prolongement éventuel des poses en 2018-2019. Le coût très élevé des balises satellites impose en effet une grande parcimonie dans leur utilisation. Les animaux marqués seront capturés avec un protocole garantissant une vitalité maximale des requins capturés et relâchés : les temps de pose des lignes de pêche et de manipulation des requins seront les plus courts possibles et tout risque de traumatisme ou de stress sera limité au maximum par un dispositif garantissant une mise à bord précautionneuse des requins et leur maintien ensuite dans les meilleures conditions possibles (dépose sur un matelas, circuit d'eau à travers les branchies pour l'oxygénation, yeux couverts par un tissu opaque pour tranquillisation).

Outre ces poses de balises, les campagnes projetées en 2016-2019 viseront l'obtention d'un indicateur d'abondance (nombre de prises par 100 hameçons) par des pêches standardisées avec le même protocole que pour les marquages, mais les manipulations sont limitées à la mesure de la longueur, le sexage et éventuellement l'observation de la maturité des femelles par des méthodes peu ou non invasives (prise de sang et échographie) ainsi que des prélèvements (1 cm<sup>2</sup>) de tissus pour une étude génétique des requins-taupes du nord-est de l'Atlantique. La survie des animaux relâchés après ces manipulations sera estimée par la pose de 10 balises de survie à un mois en 2016 et 2017. Ces balises satellite se détachent lorsque l'animal reste un jour à profondeur constante, ce qui ne peut correspondre qu'au comportement d'un animal mort. Elles émettent alors un signal codant pour cette information. Le nombre des opérations de pêche (poses de palangre) sera compris entre 60 à 80 par an sur des stations réparties le long du rebord du plateau continental du golfe de Gascogne et en mer Celtique. Ce nombre constitue un minimum au regard de l'étendue de la zone à couvrir (environ 130 000 km<sup>2</sup>).

La règle des 3R sera ainsi prise en compte : Le Remplacement par une autre espèce n'est pas possible puisque les résultats recherchés imposent de pêcher et poser des balises sur des animaux d'une espèce particulière, en liberté et dans une zone spécifique. La Réduction est prise en compte en limitant le nombre d'animaux pêchés, manipulés et marqués au strict minimum (Nombre maximal=1000 animaux manipulés). Enfin, le Raffinement correspond à la recherche et la mise en œuvre de conditions optimales pour la survie des poissons pêchés et relâchés.

7260. Les ulcères gastriques du cheval, connus également sous le nom d'EGUS (Equine Gastric Ulcer Syndrome), sont très fréquents dans la population équine et peuvent entraîner des douleurs, une modification du comportement et des baisses de performance. Les études épidémiologiques sur le sujet rapportent des prévalences de 53% à 100% en fonction des populations suivies, avec notamment 80 à 100% des chevaux à l'entraînement touchés.

Une étude épidémiologique suggère que la consommation de luzerne aurait un rôle protecteur contre les ulcères gastriques chez le cheval. Il a également été observé que la consommation de foin de luzerne permettait de limiter l'acidité gastrique lors des premières heures de jeûne postprandial. Cependant, les études sur le sujet sont très peu nombreuses et aucune ne s'est intéressée aux mécanismes par lesquels la luzerne peut prévenir l'apparition des EGUS dans l'écosystème gastrique.

La présente étude a pour but d'évaluer l'impact de la consommation de différentes fractions de luzerne sur l'écosystème et sur la santé gastrique pour comprendre quel est le constituant de la luzerne qui pourrait avoir cet impact positif sur la santé gastrique du cheval.

Par ailleurs, bien qu'il n'y ait pas de publications scientifiques sur le sujet, il est supposé que la consommation de luzerne pourrait avoir un impact également sur l'écosystème du gros intestin. En parallèle des travaux sur l'écosystème gastrique, cette étude visera à évaluer l'impact de la consommation de luzerne sur différents paramètres représentatifs de la santé intestinale en conditions contrôlées.

Deux fractions de luzerne seront testées dans un dispositif en carré latin versus du tourteau de tournesol.

Six chevaux de race Trotteur Français seront intégrés dans le projet. L'essai doit nécessairement être réalisé sur des chevaux car c'est l'espèce cible. L'utilisation de six chevaux est un minimum pour obtenir une puissance statistique suffisante. Les chevaux seront répartis par paire recevant chacune, suivant la période, une ration comprenant une fraction de luzerne ou bien du tourteau de tournesol. Chaque période durera dix-huit jours et sera séparée de la suivante par cinq jours de « wash-out ».

A la fin de chaque période, un prélèvement de contenu gastrique et un prélèvement de fèces seront effectués par gastroscopie et par fouille rectale respectivement. Une anesthésie locale sera réalisée pour les prélèvements gastriques. Pour les chevaux qui le nécessiteront, un tranquillisant sera administré.

Les modifications de l'écosystème gastro-intestinal seront définies à partir de mesures directes de la composition bactérienne et de l'activité microbienne.

Les chevaux seront observés quotidiennement afin de vérifier leur état de santé et de bien-être. En cas de rupture de cet état, tout animal sera retiré du protocole et soigné.

7261. Cette expérimentation a pour but de tester et quantifier l'influence de la température, de la photopériode et de l'abondance de nourriture, sur la croissance de trois espèces de vertébrés ectothermes (sans régulation de la température du corps): les poissons *Polypterus senegalus* (polyptères) et *Auchenoglanis occidentalis* (poissons-chats) et la tortue semi-aquatique *Pelusios castaneus*

(pleurodires). L'expérimentation proposée s'inscrit dans un travail de thèse qui porte sur l'étude des ectothermes africains comme marqueurs des paléoenvironnements.

Les animaux qui ne produisent pas leur propre chaleur tels que les poissons et les tortues, sont sensibles aux variations de leur environnement. Sous climat tropical, l'alternance des saisons sèches et humides entraîne des taux de croissance variables. Cela s'exprime au niveau du squelette par des marques de croissance squelettiques (MCS) qui sont observables sur sections histologiques. Les paramètres environnementaux intervenant dans la régulation de la croissance interagissent de façon complexe. Il est nécessaire de comprendre l'action de chaque paramètre environnemental afin de pouvoir interpréter correctement le signal des MCS sur des spécimens actuels dans un premier temps, pour pouvoir extrapoler plus tard sur des échantillons fossiles.

Ces espèces ont été choisies d'après :

- leur abondance dans le registre fossile continental du Néogène africain (approximativement les 20 derniers millions d'années) et donc de leur pertinence comme marqueur paléoenvironnemental
- la présence vérifiée de MCS observables chez des spécimens fossiles (travaux de la thèse)
- la facilité de collecte (ces espèces sont communes et faciles à obtenir auprès des grossistes)

En raison de la variabilité interindividuelle naturellement présente, il est nécessaire de disposer d'un nombre suffisant d'individus par espèce, mais en faisant attention à ne pas surpeupler les aquariums. En effet, les fortes densités favorisent le développement des maladies, et réduisent l'espace alloué à chaque individu, facteur limitant à la croissance normale des individus. Ainsi notre expérimentation se déroulera dans les conditions de vie optimales (densité, oxygénation, qualité de l'eau) pour les individus aussi bien par soucis d'éthique que par nécessité scientifique.

Poissons et tortues occuperont des aquariums différents, mais seront élevés dans des conditions d'élevage similaires (notamment dimensions des bassins, taille des individus, qualité et renouvellement de l'eau). 80 animaux seront utilisés au total.

Chaque espèce de poisson est représentée par 30 individus répartis dans 5 lots qui seront exposés à des conditions environnementales différentes (température, alimentation et photopériode) illustrant les variations saisonnières en régime tropical africain. Ce nombre permet d'avoir 6 individus par lots, nombre suffisant pour effectuer des études statistiques de répétabilité. Ce nombre prend également en compte une éventuelle perte d'animaux durant le transport, ou l'expérimentation elle-même. Pour les tortues, 20 spécimens sont répartis dans 3 lots (6 à 8 individus par lot) suivant les mêmes contraintes que les poissons.

Toutes les mesures seront prises pour réduire le stress et la douleur infligés aux animaux. Les poissons seront anesthésiés pour les manipuler et assurer les mesures et les injections. Pour les tortues, la contention manuelle sera la plus adaptée car une anesthésie peut s'avérer dangereuse. Un suivi quotidien des animaux, en particulier après les manipulations, nous permettra d'observer le bon état de santé de chaque individu.

L'expérimentation en conditions contrôlées vise à comprendre l'influence respective sur la croissance des animaux des trois paramètres précités : température, photopériode et abondance de nourriture. Grâce à un suivi constant (passage journalier aux aquariums, mesure automatique du pH et de la température toutes les heures, mesures hebdomadaires de qualité de l'eau), et un cadrage temporel par marquage fluorescent, nous serons en mesure de déterminer les conditions environnementales qui ont agi sensiblement sur la croissance, et ainsi de les quantifier.

7262. Ce projet est un projet de Recherche Fondamentale de 5 ans.

100 milliards : c'est, approximativement, le nombre de neurones qu'on retrouve dans un cerveau humain. Et parmi cette multitude, il en existe une espèce particulière qui permet au cerveau d'ordonner au corps tous les gestes dont celui-ci est capable : ce sont les neurones moteurs, sortent de microcircuits capables de commander au corps donc. À chaque geste, chaque action, comme se lever, tourner la tête ou claquer des doigts par exemple, correspond donc un ensemble de neurones spécialisés. Chez les singes, des neurones moteurs d'un genre un peu particulier ont été mis en évidence : les neurones miroirs. On pense - sans en avoir de preuve directe - qu'ils existent de la même façon chez l'homme. Ils permettraient en fait de se voir agir à la place de l'autre, comme dans un miroir. Un phénomène neurologique qui serait à l'origine d'un apprentissage "par imitation". Ces neurones pourraient également être impliqués dans la compréhension des autres et de leurs actions, de mieux appréhender leur comportement. Un rôle essentiel donc. Mieux comprendre la plasticité de ces neurones miroirs est l'objectif principal du présent projet

Quelle(s) espèce(s) et nombre approximatif d'animaux est-il prévu d'utiliser ?

Le projet impliquera au maximum 6 macaques rhésus adultes des deux sexes.

Le degré de sévérité prévu des procédures est modéré en raison des interventions chirurgicales. Tous les animaux sont euthanasiés à la fin du projet pour validation histologiques des zones d'enregistrements et d'injections.

Application des 3 Rs

1. Remplacement.

Les grandes fonctions du cerveau, la perception, les mouvements, l'intelligence, l'attention, la mémoire, etc. ne peuvent pas être exprimés par des cellules, seulement par des hommes ou des animaux.

2. Réduction.

Les animaux inclus dans le projet seront leurs propres témoins, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Le principe de réduction est également garanti par des calculs statistiques qui déterminent, pour chaque procédure, combien d'animaux sont nécessaires pour assurer la validité scientifique des résultats. Les enregistrements des neurones dans le cerveau chez le singe réalisés dans le présent projet requièrent au maximum 3 sujets différents.

3. Raffinement. Le singe est le seul modèle animal qui comme l'homme explore le monde principalement avec ses yeux et sa main, et interagit de façon complexe avec ses congénères. Il est donc le seul qui puisse nous enseigner le fonctionnement des cellules cérébrales et de mesurer des variations dans la plage temporelle des millisecondes où les neurones traitent l'information. Pour assurer leur bien-être, les animaux sont hébergés en groupes d'au moins deux animaux dans un milieu enrichi qui leur permet d'exprimer

leurs deux activités naturelles principales : le fourrage pour trouver de la nourriture et les interactions sociales avec leurs congénères. Le niveau de souffrance causé aux animaux pour ce projet ne sera généralement que léger, bien qu'une douleur transitoire modérée puisse se produire en raison des opérations chirurgicales ; elle sera atténuée par l'administration de médicaments pré et post-chirurgicaux appropriés sous contrôle vétérinaire.

7263. Notre société développe des vaccins thérapeutiques destinés aux patients atteints de cancer. Ils sont basés sur une technologie innovante qui vise à rendre les cellules tumorales sensibles au système immunitaire du patient en lui administrant un vaccin. Le vaccin est composé d'un peptide (petite protéine) dit « immunogène » c'est-à-dire capable d'induire une réponse immunitaire qui sera spécifiquement dirigée contre un déterminant (appelé un épitope) des cellules tumorales, cet épitope naturellement exprimé par les cellules tumorales mais trop peu pour générer une réponse immunitaire efficace par lui-même est donc qualifié de « non immunogène » ou de « cryptique ».

Tous les travaux menés par notre société visent donc à choisir le bon couple composé d'un vaccin efficace (appelé peptide optimisé) et d'un peptide cible « cryptique » faiblement présenté à la surface des cellules tumorales donc non immunogène mais qui sera reconnu par les cellules immunitaires induites par la vaccination avec le peptide optimisé. L'étape finale consiste enfin à combiner plusieurs peptides optimisés dans un même vaccin afin de cibler plusieurs épitopes à la surface des cellules tumorales. Ces vaccins de deuxième génération, dits « polypeptidiques », permettent d'une part de limiter le risque d'échappement tumoral et d'autre part de proposer le vaccin à plus de patients, chaque tumeur exprimant des épitopes différents.

L'efficacité de nos produits est par ailleurs liée à l'expression par le patient vacciné, d'un déterminant particulier du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (ou CMH). Le CMH est l'équivalent pour les tissus du système ABO pour le système sanguin, et est notamment impliqué dans la tolérance ou le rejet des greffes. Chaque individu exprime un certain nombre de déterminants du CMH plus ou moins fréquents qui doivent correspondre à ceux qui sont ciblés par le vaccin.

Notre portefeuille clinique se compose actuellement de 2 vaccins : le premier est composé d'un peptide qui cible la télomérase (protéine impliquée dans l'immortalité des cellules tumorales) actuellement en essai clinique de phase IIb. L'autre est un produit de seconde génération composé d'un polypeptide, actuellement en essai clinique de phase I, et qui cible trois antigènes de tumeurs universels. Ces 2 vaccins sont destinés aux patients exprimant la molécule du CMH la plus fréquente, HLA- A\*0201 qui est exprimé par 45% de la population. Afin que les patients qui n'expriment pas HLA- A\*0201 puissent également bénéficier de nos traitements, nous souhaitons développer un vaccin destiné aux patients exprimant une autre molécule du CMH, HLA-A\*2402 qui représente 25% de la population caucasienne et jusqu'à 40% de la population asiatique.

La recherche de couple de peptide optimisé (vaccin) et de peptide cryptique (également nommé peptide « natif » car naturellement présent à la surface des cellules tumorales) se fait en plusieurs étapes. Un gros travail amont de design *in silico* puis de test cellulaire *in vitro* permet d'éliminer un grand nombre de peptides candidats (plus d'un quart suivant notre expérience) qui ne présentent pas les caractéristiques requises (peptide optimisé non immunogène, peptide natif immunogène, etc.). Pour les couples répondant aux critères requis, la dernière étape de validation est l'évaluation qualitative et quantitative de la réponse immunitaire générée. Pour cela, des tests *in vivo* sont inévitables pour déterminer parmi les candidats restants, celui qui sera le plus à même de générer la meilleure réponse immunitaire chez l'homme ; ces tests sont réalisés à l'aide d'un modèle de souris transgéniques, qui n'exprime plus les molécules du CMH murins mais le déterminant humain ciblé, dans ce cas la molécule HLA-A\*2402. Les souris sont vaccinées dans les mêmes conditions que chez l'homme ce qui permet d'évaluer la capacité d'un vaccin candidat à induire une réponse immunitaire la plus forte et la plus spécifique possible. Ces tests permettent également de confirmer la reconnaissance des cellules tumorales exprimant l'épitope cryptique par les cellules immunitaires stimulées par le peptide optimisé. Cette étape appelée « reconnaissance croisée » est cruciale pour l'efficacité du vaccin. Dans un souci de raffinement, les souris seront en cages collectives, lors de l'immunisation un massage sera effectué au point d'injection pour éviter l'accumulation local du produit qui pourrait être douloureux, en cas de plaie apparente un traitement quotidien de Bétadine sera appliqué.

La molécule HLA- A\*2402 étant exprimée par un nombre réduit de patients (25% de la population caucasienne), nous avons choisi de cibler quatre antigènes universels afin de proposer notre produit au maximum de patients. Pour chacun des quatre antigènes, une fois le meilleur couple peptide optimisé/peptide cryptique natif sélectionné, l'agencement des quatre peptides optimisés retenus au sein du vaccin polypeptidique final sera déterminé chez la souris transgénique en utilisant un schéma d'expérimentation limitant au maximum le nombre de combinaisons à tester. L'approche expérimentale utilisée *in vivo* ainsi que l'ensemble des travaux amont *in silico* puis *in vitro* permettent finalement de réduire le nombre de souris à 162 souris.

7264. L'objectif de ce travail est d'étudier l'implication des neurones à GnRH, neurones qui contrôlent la fertilité et la survie de l'espèce, dans des processus physiologiques autres que ceux impliquant la fonction de reproduction. Des résultats préliminaires obtenus à Lille chez des souris chez qui nous avons entravé sélectivement l'activité de sécrétion des neurones à GnRH par une manipulation génétique, montrent que les souris mutantes développent un phénotype obèse qui pourrait être liée à une altération du catabolisme du tissu adipeux. Les expérimentations faisant l'objet de cette demande visent à tester l'hypothèse selon laquelle le neurone à GnRH entre directement en contact avec le tissu adipeux par voie polysynaptique pour en contrôler l'activité catabolique en collaboration. Un total de 60 animaux sera nécessaire pour ce projet. Nous injecterons sous anesthésie des traceurs neuronaux permettant de tracer les voies nerveuses entre les tissus adipeux testiculaires et le cerveau. L'approche *in vitro* ne peut être utilisée comme tentative de remplacement. En ce qui concerne la réduction du nombre d'individus, les effectifs de souris envisagées seront limités à ce qui est nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques fiables pour une publication des résultats, afin que la communauté scientifique puisse bénéficier des données obtenues et ainsi éviter une redondance avec des expérimentations ultérieures. Enfin, pour le volet raffinement, notre expérimentation prévoit l'application d'anesthésique morphinique et d'anti



inflammatoires après l'opération ainsi qu'un suivi rigoureux de la souffrance. L'interruption de l'expérience est réalisée au moindre signe de pathologie induite par l'injection du traceur. Les données obtenues chez la souris permettront aussi de mieux comprendre les mécanismes nerveux impliqués dans certaines pathologies du comportement alimentaire chez l'Homme.

7265. La radiothérapie reste aujourd'hui incontournable dans la prise en charge du cancer de l'abdomen. Le but de la radiothérapie est de diminuer la tumeur tout en préservant les tissus et organes la contournant. Les patients traités par radiothérapie pour des cancers de l'abdomen développent, pour 10 à 20% d'entre eux, des complications intestinales plusieurs années après la fin du traitement. Malgré le grand nombre de molécules pharmacologiques disponibles, aucune n'a démontré de réelle capacité curative dans le cadre de la réparation des lésions radio-induites. En revanche, des résultats expérimentaux convaincants, sur différents modèles animaux mais aussi sur des cas cliniques compassionnels, montrent que l'injection itérative de cellules stromales Mésoenchymateuses (CSM) réduit les lésions colorectales sévères induites par les rayonnements ionisants. Cependant ce bénéfice thérapeutique n'est pas suffisant et nécessite l'injection de grandes quantités de cellules souches.

La question se pose sur la capacité d'un type de cellule à améliorer la régénération d'un organe entier. Plus récemment, des études ont permis la croissance de Cellules de l'intestin (CSI) en utilisant des molécules spécifiques pour obtenir une architecture complexe. L'objectif de ce projet est de développer une stratégie innovante en combinant les CSM et CSI afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique des CSM pour le traitement des ulcères colorectaux sévères induits après irradiation chez la souris (2800 souris souche C57BL/6J).

Tout au long de la procédure expérimentale les animaux seront suivis par du personnel compétent. Toutes les manipulations seront effectuées sous anesthésie. Tout animal présentant des signes comportementaux anormaux sera euthanasié de façon anticipée. La durée de l'expérimentation est optimisée, elle prend en compte le délai d'installation des lésions et du temps de régénération du tissu. Afin d'optimiser le nombre d'animaux permettant l'obtention de résultats statistiques, les différentes expériences seront faites successivement.

Cette étude vise d'apporter des preuves de concept précliniques pour une utilisation future de ces combinaisons en tant que traitement pour les patients traités par radiothérapie suite à un cancer de la zone abdomino-pelvienne.

7266. Les techniques et les approches chirurgicales évoluent constamment d'où la nécessité de suivre des formations continues afin de maintenir un niveau de connaissance satisfaisant et assurer une médecine de qualité.

Le porc est reconnu comme modèle de choix pour la formation chirurgicale, il ne peut être remplacé par d'autres modèles.

L'intérêt de ce projet réside dans l'offre de formation à des approches tant pédagogiques qu'innovantes en chirurgie gynécologique et digestive, ouverte ou laparoscopique, dans le but d'un approfondissement des compétences pour des praticiens en exercice.

Le nombre total d'animaux prévus sur 5 années est de 150 porcs à raison de 30 porcs maximum par an.

Dans le cadre des 3Rs :

Remplacement : pour les besoins de formation à certaines techniques spécifiques le remplacement des animaux n'est pas toujours possible.

Réduction : le nombre d'animaux est fixé au minimum afin de permettre aux stagiaires de mettre en pratique les gestes enseignés (4 à 5 chirurgiens par animal)

Raffinement : afin de réduire le stress, les animaux arrivent à l'animalerie la veille de la session prévue. Chaque animal est hébergé dans un box individuel et reçoit une ration identique à celle fournie par le fournisseur d'animaux, avec de l'eau à volonté. Des moyens anesthésiques et antalgiques sont utilisés pour la chirurgie.

7267. Ce projet vise à évaluer la régénération musculaire et osseuse en ciblant le système vasculaire, et d'étudier l'effet de l'apport de cellules spécifiques au niveau du tissu lésé dans un cadre à visée thérapeutique.

La lésion sera réalisée par irradiation au niveau de la patte postérieure de l'animal anesthésié. L'administration des cellules souches sera réalisée localement, dans le muscle (tibialis anterior) ou dans le tibia, ainsi que par voie intraveineuse.

Pour évaluer cet effet dans des conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques. Des souris immuno-déficientes Nude seront utilisées car ce modèle permet la greffe de cellules humaines. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 1150.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale et des points limites sont adaptés. Différents paramètres fonctionnels seront mesurés pour évaluer la régénération tissulaire et vasculaire dans le cadre du traitement par thérapie cellulaire.

7268. Le projet vise à élever en hébergement individuel des oiseaux domestiques adultes afin de pouvoir identifier au mieux leurs gamètes (cellules de reproduction) qui seront par la suite utilisés pour faire de la conservation de la diversité génétique. Une prise de sang sera réalisée sur chaque animal afin de conserver, en plus des gamètes, des échantillons de sang pour des études génomiques et aussi pour préserver la possibilité de rechercher ultérieurement le portage de maladies encore inconnues à l'heure actuelle.

Au plan scientifique, l'objectif du projet est d'assurer un complément de sécurisation de races/lignées par la constitution de banques génomiques et de cellules de reproduction.

Nous utiliserons un nombre maximum d'animaux qui diffèrera selon les espèces en fonction en particulier de leurs capacités de reproduction propres.

L'objectif est de conserver 25 races de Gallus, 4 races de pintades, 4 races de dindes et 10 races de cailles dans la totalité du projet. Au total nous utiliserons 4955 animaux toutes espèces confondues sur 5 ans.

Tout au long du projet, l'application de la règle des 3R sera considérée :

Remplacement : comme l'objectif est d'obtenir des gamètes, il est indispensable d'avoir des animaux reproducteurs

Réduire : Dans chaque espèce le nombre d'animaux utilisés varie en fonction de leur fertilité. Nous utiliserons un minimum par troupeau ou race. Par exemple, chez Gallus, 45 mâles est le nombre minimum permettant d'avoir une diversité génétique raisonnable par troupeau et par race. Pour le test de fertilité, 90 femelles est le nombre minimum pour avoir une approche de variabilité individuelle à l'intérieur d'un troupeau ou race.

Raffiner : Les dindes seront hébergées en groupe au sol. La plupart des poules sera en condition d'élevage classique (3/5). Une partie (2/5) sera en cage individuelle enrichie, afin de pouvoir identifier les œufs et la fertilité individuelle. Les pintades et les cailles seront également en cages individuelles enrichies.

Tous les mâles (à l'exception des dindons, non agressifs) seront en hébergement individuel afin d'éviter des blessures graves voir mortelles issues de la compétition entre eux, et d'avoir des animaux moins stressés.

Toutes les cages sont contiguës et grillagées, avec un système d'abreuvement et d'alimentation adapté à l'espèce. Les animaux peuvent se voir. De plus, les cages seront enrichies en y plaçant des objets qui serviront de jouet à picorer.

7269. Objectifs : mesurer l'efficacité parasitologique d'un protocole de traitement à l'éprinomectine sur la charge parasitaire (bilans nécropsiques) après infestation expérimentale de caprins

Matériels et méthodes (simplifié):

1. les animaux : 8 animaux par modalité de traitement, 5 modalités soit au total 40 animaux
2. les infestations parasitaires : chaque animal sera infesté naturellement ou sera inoculé expérimentalement selon les protocoles définis dans la littérature internationale
3. au moins 5 groupes d'animaux seront définis :
  - a. 1 groupe témoin non traité
  - b. 4 groupes traités par l'éprinomectine (2 doses, administration préventive ou curative), ce traitement intervenant à une date fixée avant ou après l'inoculation selon l'objectif
4. L'ensemble des animaux seront euthanasiés dans un délai fixé après le traitement et dépendant de la finalité préventive ou curative soit 5 jours après un traitement curatif et 25 jours après inoculation lors d'un traitement préventif soit 40 animaux.
5. Après abattage des animaux (euthanasie au T61©), un bilan parasitaire sera réalisé par comptage des stades parasitaires dans les tissus cibles selon les procédures en vigueur.

Résultats :

La comparaison des charges parasitaires des lots traités avec le lot témoin de référence fournira les données d'efficacité parasitologique pour la molécule testée. Ces données seront confrontées à celles de la littérature disponible. Selon les souches de parasites utilisées et les doses d'anthelminthique testée, la mesure de l'efficacité constitue une information importante pour le contrôle des helminthoses chez les ruminants.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : Le protocole de confirmation par infestation expérimentale, traitement puis abattage (« controlled efficacy test » des anglo-saxons) est le seul valide pour conclure à l'efficacité d'un antiparasitaire interne (la coproscopie ne reflétant *in fine* que la ponte des parasites). Il implique, par là même, l'emploi de l'espèce hôte (ruminant) comme animal expérimental. Le protocole d'infestation est standardisé et assure une infestation qualifiée de sub-clinique c'est-à-dire sans conséquence visible sur l'état de santé avec des animaux conduits et logés en zéro-pâturage c'est-à-dire sans autre infestation additionnelle. La taille des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (8 animaux par lot).

7270. La présence d'insectes est une nuisance pour le cheval qui peut être la cause de maladies et qui peut également altérer son bien-être et son comportement. De plus, les réactions, parfois violentes, des chevaux soumis à la présence de ces insectes peuvent se révéler dangereuses pour son entourage. Des insecticides à application cutanée sont donc utilisés pour minimiser cette nuisance. Pour mettre sur le marché une nouvelle formule de produit, celle-ci doit être testée *in vivo* afin d'assurer qu'elle formule n'est pas dangereuse pour la santé des chevaux. Les tests doivent être réalisés sur des chevaux car il s'agit de l'espèce cible.

La présente étude a pour but d'évaluer l'impact sur la peau d'une nouvelle formule d'insecticide. Deux doses d'insecticide seront successivement testées sur un, puis sur trois chevaux suivant le protocole précisé ci-dessous.

Dans un premier temps la dose commerciale du produit sera testée sur un cheval. Un patch imbibé du produit sera appliqué sur la peau rasée du cheval. Après trois minutes d'application, le patch sera retiré et l'état de la peau du cheval sera évalué selon le tableau de cotation de l'OCDE. Si aucun effet corrosif n'est observé, le test sera reconduit pour une durée d'une heure puis le patch sera retiré, et la peau sera observée. Si aucun effet corrosif n'est observé, un patch sera alors appliqué sur trois chevaux pour une durée de quatre heures. A la fin des quatre heures, l'état de la peau sera de nouveau évalué. Les trois chevaux seront ensuite gardés en observation durant quatorze jours. Au cours de cette période, la peau des chevaux sera contrôlée quotidiennement au niveau du site d'application et la santé générale des chevaux sera évaluée quotidiennement. Dans le cadre du suivi de la santé, une prise de sang sera effectuée avant l'application du produit, puis sept et quatorze jours après application.

Si la peau des chevaux et leur santé générale ne présentent pas de signes anormaux au terme de la période d'observation, une dose supérieure du produit (dix fois la dose commerciale) sera testée suivant le même protocole : une première application pendant trois

minutes sur un cheval, puis pendant une heure s'il n'y a pas d'effet corrosif observé, puis pendant quatre heures sur trois chevaux s'il n'y a pas d'effet corrosif observé.

En cas de rupture de la santé ou du bien-être observé chez un cheval, celui-ci sera immédiatement retiré du protocole et soigné.

7271. Outre les complications métaboliques, il est maintenant reconnu que l'obésité favorise la survenue et affecte le pronostic de nombreux cancers. Or, le surpoids et l'obésité sont en augmentation constante et leur prévalence atteint maintenant des dimensions alarmantes. Ainsi, l'augmentation de ces deux pathologies, cancer et obésité, fait du lien entre ces deux maladies un sujet d'actualité important. L'étude de l'effet de l'obésité est d'un intérêt particulier dans le cadre du mélanome, un cancer de la peau très agressif, puisque la couche la plus profonde de la peau est composée majoritairement de tissu graisseux. Cette proximité ainsi que des données récentes montrant une corrélation entre l'obésité et l'agressivité du mélanome soulignent l'intérêt majeur d'étudier l'effet de l'obésité sur la progression de ce cancer.

Jusqu'à-là, nous avons montré *in cellulo* qu'il s'établit un véritable cercle vicieux entre cellules graisseuses et cancéreuses. En effet, d'une part nous avons observé une perte du contenu lipidique chez les cellules graisseuses ainsi que des modifications dans leur profil sécrétoire et, d'autre part, un potentiel invasif augmenté chez les cellules tumorales, ce qui pourrait conduire chez le patient à une dissémination métastatique plus élevée. Nous souhaitons maintenant évaluer ce même dialogue dans un contexte d'obésité. Cependant, cette étude est rendue difficile par le fait qu'il n'existe pas de modèle cellulaire permettant de reproduire les conditions de l'obésité. Nous devons ainsi avoir recours à un modèle murin. Afin de reproduire au plus près la maladie chez l'homme, nous utiliserons des souris transgéniques développant spontanément des mélanomes (latence d'environ 40 semaines) que nous rendrons obèses avec un régime hyperlipidique. Nous suivrons ensuite, sur 45 animaux en régime normal et 45 en régime hyperlipidique (l'ensemble étant issu d'un élevage de 30 souris), la progression de mélanomes. Pour cela, les souris seront observées chaque semaine et, dès l'apparition d'un mélanome, la taille de la tumeur sera évaluée au cours du temps. Nous pourrons ainsi étudier l'effet de l'obésité sur le temps de latence avant l'apparition des mélanomes mais aussi sur l'agressivité des tumeurs et la dissémination métastatique. Notre étude concernera uniquement les souris mâles puisque des études épidémiologiques ont montré que l'obésité favorise le développement et l'agressivité des mélanomes uniquement chez les hommes. Le mélanome étant un cancer cutané, le suivi des animaux est facilité. Aucune intervention invasive n'est nécessitée pour suivre la croissance tumorale, ce qui permet de diminuer le stress pour l'animal et de réduire le nombre de souris incluses dans ce protocole (puisque pour suivre d'autres types de tumeurs, il faut souvent autopsier des animaux au cours du développement tumoral). Les souris seront hébergées en groupe de 3 ou 5 afin de participer au bien être de ces animaux dont les interactions sociales sont primordiales.

7272. La grippe est une maladie infectieuse causée par les virus Influenza A (VIA) ou B. Chez l'homme et la plupart des mammifères cibles des VIA, la grippe se traduit par une maladie inflammatoire aiguë de l'appareil respiratoire dont les mécanismes sont encore mal connus. Malgré la vaccination et la disponibilité d'antiviraux, elle reste un problème majeur de santé publique humaine et vétérinaire. Ainsi, selon l'OMS, les infections grippales associées aux épidémies de grippe saisonnière (virus de sous-types H1N1 et H3N2) touchent 5 à 15% de la population humaine mondiale chaque année, et sont responsables de 250 000 à 500 000 décès. Par ailleurs, outre l'impact sanitaire et économique annuel important, la circulation de VIA hautement pathogènes de sous-type H5N1 chez les oiseaux d'élevage ou sauvages en Asie du Sud-est et la circulation de virus d'origine porcine associés à des cas de transmission humaine sporadiques, font craindre dans l'avenir l'émergence de nouvelles souches très pathogènes pour l'homme, responsables de nouvelles pandémies grippales possiblement très dévastatrices, à l'image de la « grippe espagnole » de 1918 qui causa la mort de 20 millions de personnes. Ces éléments soulignent l'importance d'une recherche approfondie sur les mécanismes biologiques de cette maladie afin de développer de nouveaux moyens de protection contre l'infection et de traitement de l'organisme infecté.

Ce projet se propose d'étudier sur le modèle souris certains aspects clés encore mal décrits et mal compris du processus infectieux grippal au sein de l'appareil respiratoire (voies respiratoires et poumon). En particulier, il se focalisera sur la dynamique spatiale et temporelle de l'infection *in vivo* grâce à l'étude de la nature des types cellulaires qui sont réellement infectés par le virus, leur localisation précise dans l'appareil respiratoire, la mobilisation des différents types cellulaires, infectés ou non, les acteurs de la réponse défensive de l'hôte au virus dans les organes infectés, leur évolution au cours de l'infection. Pour appréhender ces phénomènes, il est indispensable d'utiliser un modèle animal tel que la souris. Bien que l'infection par les VIA soit souvent fatale dans cette espèce, la souris reproduit de manière tout à fait satisfaisante les formes aiguës de la maladie grippale. Par ailleurs, il est encore impossible de modéliser à l'aide de lignées cellulaires cultivées *in vitro* l'appareil respiratoire d'un mammifère et sa réponse à l'infection. En effet, les types cellulaires impliqués sont très divers et pour certains d'entre eux, aucune lignée cellulaire stable n'existe (cellules du système immunitaire). De plus la complexité et l'architecture du système respiratoire rendent sa reconstruction *in vitro* impossible actuellement.

Ce projet sera mené à bien *via* la construction et l'utilisation de VIA auxquels on a ajouté un gène permettant l'expression d'une protéine fluorescente dans les cellules de l'animal infecté par ce virus. Cet outil original, allié à l'utilisation de technologies de microscopie novatrices, permettra d'étudier la dynamique spatio-temporelle de l'infection *in vivo* au niveau des cellules du poumon et des voies respiratoires de l'animal entier mais surtout de caractériser des cibles réelles du virus et leur évolution dynamique au cours de l'infection. Nous étudierons également les effets de certains composés antiviraux susceptibles de moduler la réponse de l'hôte au cours de l'infection expérimentale en vue d'obtenir un effet thérapeutique ou protecteur vis-à-vis de cette infection.

Une partie du projet s'effectuera sur des systèmes cellulaires cultivés *in vitro* qui ont été mis en place au laboratoire afin de s'affranchir de l'emploi d'animaux dans un certain nombre d'étapes de mise au point. Ainsi, seules les questions nécessitant la compréhension des effets de l'infection sur l'organisme entier et la visualisation de l'infection dans les tissus pulmonaires

nécessiteront l'emploi de l'animal. Nous porterons une attention particulière à l'emploi du nombre minimal d'animaux par lot tout en maintenant des effectifs compatibles avec l'analyse bio-statistique nécessaire à l'obtention de résultats interprétables (de 3 à 7 animaux par lot selon les cas). Le projet nécessitera l'emploi d'environ 260 souris par an soit un total d'environ 1300 animaux sur l'ensemble du projet qui durera 5 ans. Deux lignées de référence, non transgéniques, seront utilisées ainsi que des lignées transgéniques exprimant une protéine fluorescente. Les animaux, nés en captivité et élevés spécialement pour notre étude dans une animalerie agréée proviendront soit directement de cette animalerie, soit d'élevages spécialisés reconnus et agréés. L'état de santé des animaux et l'enrichissement de leur milieu seront l'objet d'une attention constante et ils seront surveillés tout au long de l'expérience. L'inoculation des animaux par les virus sera effectuée par voie intra-nasale (voie non-invasive) sous anesthésie et analgésie. Leur état de santé sera évalué grâce à des critères stricts basés sur la perte de poids et l'utilisation d'un barème de score clinique approprié à l'évaluation de la souffrance. Pour limiter cette souffrance au cours de l'infection, ces deux critères permettront de définir des points limites qui signent avec certitude une évolution fatale de la maladie alors que le degré de gravité (stress et douleur) est encore modéré. L'ensemble de ces mesures nous permettront de nous conformer aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement au cours de l'expérimentation.

7273. Notre processus de production assure l'approvisionnement des matières premières critiques pour le compte de notre société sœur, leader mondial du diagnostic *in vitro*.

Suite à l'activation du système de la coagulation sanguine, le fibrinogène, molécule soluble substrat de la thrombine, est polymérisé en un caillot de fibrine. Le processus de fibrinolyse est activé concomitamment afin de réaliser la dégradation du réseau de fibrine par la plasmine. Ce processus clôturera la coagulation sanguine afin de re-perméabiliser les vaisseaux sanguins réparés et sert à empêcher la formation de thromboses. L'hémostase est donc un équilibre physiologique finement régulé entre un état de construction du caillot (coagulation) et de dissolution du caillot (fibrinolyse). Pour asseoir un diagnostic précis, lors d'évènements ischémiques ou hémorragiques, les cliniciens pratiquent des examens de biologie médicale en dosant différents paramètres de la coagulation comme le taux de prothrombine (TP, INR), le temps de céphaline activée (TCA), les produits de dégradation de la fibrine (PDF), la numération plaquettaire.

Un hybridome a été développé, il y a une vingtaine d'année, sécrétant un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique d'un produit terminal de la dégradation de la fibrine. Ce Mab entre dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisé par la majorité des hôpitaux et des laboratoires français, européens et américains pour le diagnostic de la CIVD (Coagulation Intra Vasculaire Disséminée), des thromboses veineuses des membres inférieurs (phlébites) et de l'exclusion de diagnostic de l'embolie pulmonaire. Ces dispositifs IVD exploitant ce Mab sont pleinement validés, au sens du marquage CE des dispositifs IVD, de la U.S. FDA et des divers organismes réglementaires internationaux.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production *in vivo* par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ce Mab n'a pu être caractérisé, techniquement et cliniquement validé que sur des lots issus de production en condition *in vivo*. Des efforts considérables et des essais très poussés ont été menés depuis 2009 pour tenter le transfert de cette production en condition *in vitro* (bioréacteur, flasque, fibre creuse, roller-spinner...). L'ensemble des rapports techniques concernant la capacité dudit clone à produire le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs IVD concernés, démontre la nécessité incontournable de poursuivre la production de ce Mab en condition *in vivo*.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs IVD exploitant ce Mab et en l'absence de solution alternative, impose le maintien de la production de ce réactif.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 1500 par cycle de production, soit environ 21 000 souris / an au maximum. Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis 1995, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée soit par une technique éthiquement acceptable (asphyxie par saturation progressive en CO2), soit par élongation.

7274. Etudes réglementaires de toxicité générale et de toxicocinétique et études supports à celles-ci chez le Rat (5 ans).

Dans le cadre du diagnostic, de la prévention et du traitement des maladies humaines et animales, la recherche de nouveaux médicaments apportant une meilleure sécurité d'emploi, une efficacité accrue ou tout autre avantage thérapeutique reste essentielle. Compte tenu de la complexité des organismes visés par cette recherche, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative fiable au recours à l'animal. Dans un souci de protection de la santé publique, la loi exige que l'innocuité des candidats médicaments soit évaluée lors d'études précliniques chez une espèce de rongeur et une espèce non rongeur. Ces études doivent en outre être conduites en respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) qui garantissent leur qualité et intégrité. Elles sont à ce titre l'objet d'inspections réglementaires spécifiques et sont destinées à être soumises à différentes autorités réglementaires à diverses étapes du développement de médicament.

Ce projet couvre les études réglementaires de toxicologie et de toxicocinétique telles que définies ci-dessus et réalisées chez le rat. Des études d'efficacité, de pharmacologie, d'interaction entre médicaments ou à des visées plus mécanistiques (biomarqueurs) permettant de comprendre et prédire les effets toxiques, et de sélection des candidats médicaments/doses, sont aussi couvertes par cette demande. De même que l'utilisation de rats dans des études visant l'acquisition et le maintien des compétences techniques par

le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou de méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques. Certaines de ces études peuvent en outre viser de raffiner et de réduire le recours à l'animal, voire de le remplacer dans l'avenir. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 15000 sur une période de 5 ans (une centaine d'études).

La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales (OCDE, ICH, VICH...) afin d'obtenir les résultats les plus fiables et scientifiquement pertinents tout en garantissant les plus hauts standards en matière de qualité, bien-être animal, et d'éthique (remplacement, réduction, et raffinement).

A ce titre, celles-ci requièrent :

- des rats des 2 sexes, d'environ 5 à 10 semaines d'âge (et donc d'un poids approximatif entre 75 et 500 g)
- un nombre minimal d'animaux [10 à 26 animaux/sexe/groupe et 4 groupes, soit en général 80 à 208, ou pour des besoins spécifiques justifiés et des études chroniques, jusqu'à 800 (60 rats par sexe/groupe et jusqu'à 6 groupes, dont 3 contrôles, et 80 animaux pour la toxicocinétique)],
- une durée (de un jour à deux ans),
- et des procédures (administration du candidat médicament, observations et examens réguliers, suivi médical individuel, et examens terminaux).

Pour les études « non réglementaires », les critères ci-dessus peuvent être modulés (ex. nombre de rats plus faible, un sexe seulement) dans la mesure où les objectifs diffèrent.

Les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant les dommages pour les animaux ; de fait, la plupart des animaux des premières études, réalisées sur la base d'informations très limitées, auront des effets légers à modérés, et un très faible nombre d'entre eux pourra avoir des effets substantiels. Dans les études suivantes, ceux-ci ne devraient avoir pas d'effets ou seulement avoir des effets légers à modérés. Des effets sporadiques, généralement légers et transitoires, peuvent aussi être observés du fait des propriétés pharmacologiques du candidat médicament.

Une attention particulière est apportée aux exigences de remplacement, réduction et raffinement (application de points limites si nécessaire) tout au long des études, depuis leur conception jusqu'aux données présentées aux agences afin de conduire les essais cliniques chez l'homme.

7275. Chaque nouveau médicament arrivant sur le marché a démontré son efficacité clinique en utilisation en agent seul. Cependant, la prise en charge médicale des patients a recours très fréquemment à l'utilisation de combinaisons thérapeutiques. Ces combinaisons thérapeutiques faisant intervenir différents médicaments dans un même cycle de traitement ne peuvent se mettre en place sans un rationnel scientifique solide et des preuves de concept *in vitro* mais aussi *in vivo*.

Les entreprises du médicament se tournent vers notre expertise afin d'avoir accès à des modèles innovants de cancers permettant d'obtenir des données consolidées au-delà des données générées en interne ou obtenues sur d'autres modèles précliniques.

L'objectif de ce projet est de déterminer *in vivo* les propriétés antitumorales de combinaisons thérapeutiques innovantes (petite molécule et/ou biothérapie) afin d'identifier les combinaisons potentiellement efficaces en clinique. L'étude de ces combinaisons thérapeutiques permettra de définir leur efficacité antitumorale ainsi que les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont ceux qui, actuellement, approchent au mieux la complexité des tumeurs humaines en l'état actuel de l'art. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 140 PDX différentes représentatives des tumeurs solides.

Les essais de combinaisons thérapeutiques interviennent à la suite des étapes de validation *in vitro* et *in vivo* des candidats médicaments utilisés en agent seul.

Cependant, il est essentiel, avant toute administration à l'Homme, de valider le potentiel thérapeutique de ces combinaisons thérapeutiques dans des modèles reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des médicaments potentiels. Ces études *in vivo* constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament mais ce travail sur organisme entier ne peut être remplacé.

Pour autant, seuls les candidats médicaments ayant démontré une efficacité antitumorale en agent seul, comme demandé par les agences de régulation, seront évalués en combinaison. Réduisant ainsi les essais aux seules combinaisons ayant un potentiel d'utilisation clinique fort.

Le projet est conçu pour réaliser 60 études, réparties sur 18 mois. Il vise à évaluer différentes combinaisons thérapeutiques sur différents modèles de PDX. Les études nécessiteraient un nombre total de 6210 animaux avec un taux de prise moyen de 58%.

L'ensemble des études se déroulent dans des conditions d'hygiène rigoureuses afin de garantir un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé. Les animaux sont hébergés en petits effectifs par cage. Les cages sont changées fréquemment. Dans chaque cage, les animaux reçoivent un enrichissement de milieu (Neslets). Les animaux sont anesthésiés lors de la greffe. Leur état physique et leur comportement sont contrôlés quotidiennement. En cas d'apparition de signes cliniques, les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse seront appliquées: ajout d'enrichissement supplémentaire (bâtons de bois, Dôme house) en cas de bagarre, supplémentation de l'alimentation en gel nutritif en cas de perte de poids.

7276. La transplantation d'îlots pancréatiques constitue aujourd'hui une alternative à l'insulinothérapie chez le patient diabétique de type 1. Cependant, le manque de donneurs, ainsi que le recours aux immunosuppresseurs limitent le succès à long terme et le déploiement à grande échelle de cette thérapeutique. C'est pour dépasser ces limites que des dispositifs d'encapsulation, appelés pancréas bio-artificiels, ont été mis au point. Parmi eux, notre dispositif permet d'encapsuler des cellules sécrétrices d'insuline, à l'aide de membranes sélectives qui sont imperméables aux molécules impliquées dans le rejet mais perméables au glucose, à l'insuline, à l'oxygène et aux nutriments. Ainsi, aucun traitement immunosuppresseur ne serait nécessaire et l'utilisation de différents types de cellules pourra être envisagée.

Afin d'étudier la survie cellulaire, nous avons créé un modèle *in vitro* reproduisant les conditions internes du dispositif. Au cours de cette étude nous avons montré que ces conditions pouvaient être délétères avec activation des voies de l'hypoxie et de l'inflammation, réduisant la survie des cellules. Dans le but d'améliorer la viabilité des îlots et grâce à notre modèle *in vitro*, nous avons identifié les premiers candidats permettant de diminuer ces phénomènes délétères. La prochaine étape de ce projet va consister à valider l'effet bénéfique de ces molécules dans le dispositif médical sur la survie des îlots ou des cellules  $\beta$ .

Nous avons choisi le rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Ainsi, des dispositifs d'encapsulation seront implantés chez des rats mâles (de lignée Wistar) rendus diabétiques un mois avant infusion des cellules sécrétrices d'insuline (îlots pancréatiques de rat ou des cellules à insuline de rat ou des cellules à insuline génétiquement modifiées d'origine humaine) avec les molécules d'intérêts. Pour chaque groupe expérimental 20 rats diabétiques seront utilisés afin d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques. Au total, 360 rats diabétiques seront utilisés, ce qui nécessite, au vu des 80% d'efficacité du modèle d'induction du diabète utilisé, l'emploi de 450 rats sains. Enfin l'obtention d'îlots pancréatiques de rat pour la deuxième partie de l'étude nécessitera l'utilisation de 600 rats sains, portant le nombre total d'animaux nécessaires à 1050. Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Le principe de remplacement a été respecté car un premier screening des molécules a été réalisé *in vitro* montrant leur non toxicité et des effets bénéfiques. Ces derniers ne peuvent être définitivement validés qu'*in vivo*. Le principe de réduction a été appliqué en optimisant les isolements d'îlots permettant de mettre à mort moins d'animaux pour le même nombre d'îlots.

7277. Le projet vise à améliorer les connaissances scientifiques sur les mécanismes de transfert d'une classe de polluant environnemental émergent, les retardateurs de flamme bromés (RFB) vers les produits animaux ainsi que sur les facteurs de variation à l'échelle de l'animal, au moyen d'essais *in vivo* complétés par une démarche de modélisation. Les RFB sont couramment utilisés depuis les années 60-70 pour ignifuger les textiles, les matériaux de construction et les équipements électriques et électroniques.

Selon les autorités sanitaires européennes et nord-américaines, l'alimentation est la principale source d'exposition humaine aux retardateurs de flamme bromés, dont les hexabromocyclododécanes (HBCD). Même si ces molécules ne sont pas réglementées, elles sont suspectées ou considérées comme des perturbateurs endocriniens, avec des effets notamment sur la fertilité et la thyroïde. Leur fréquence de détection dans les produits animaux est faible, mais les plans de surveillance révèlent des concentrations parfois très élevées (7000 fois la concentration médiane) dans certains échantillons d'œufs et de viandes de porc et de volaille. De telles teneurs pourraient représenter un danger pour la santé des consommateurs et nuire à l'image des filières animales. Toutefois, ni les sources de contamination, ni les niveaux d'exposition en élevage ne sont connus. En outre, les processus d'absorption, métabolisation, stockage et excrétion de ces polluants émergents, qui conditionnent le niveau de contamination des produits, ne sont que très partiellement élucidés. Cette méconnaissance place les opérateurs des filières et les autorités de surveillance dans l'impossibilité de prévenir la contamination des produits.

Le projet comporte notamment une expérimentation sur 56 porcs charcutiers qui permettra d'obtenir des références sur l'accumulation et l'élimination dans les tissus porcins résultant de l'exposition à deux niveaux d'une molécule (a-HBCD) de la famille des RFB. Ces données permettront d'estimer les paramètres toxicocinétiques du transfert à l'échelle de l'animal, et de construire des modèles mathématiques.

Le protocole s'efforce de réduire le nombre de porcs utilisés. Ainsi, lors de la phase initiale où les animaux sont exposés, sans différence entre les groupes exposition et élimination, le nombre d'unités expérimentales est divisé par deux lors des abattages. Par ailleurs, le protocole s'efforce d'améliorer les procédures. Ainsi, le marqueur est mélangé à l'alimentation afin d'éviter une manipulation pour la prise orale. De même, les porcs ne sont pas logés en stalle individuelle, mais sont bloqués en réfectoire seulement aux horaires des repas. Enfin, les méthodes alternatives ne peuvent être envisagées en l'absence de données existantes sur l'exposition à de nouveaux polluants émergents.

7278. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique qui affecte le système nerveux central (CNS). La SEP est généralement diagnostiquée entre 20 et 40 ans, elle touche 2,5 millions de personnes dans le monde, environ 80 000 patients en France, et atteint deux fois plus les femmes que les hommes. Elle représente ainsi la première cause de handicap chez les jeunes adultes

La SEP est très probablement une maladie neurologique auto-immune médiée par les lymphocytes T. Elle est caractérisée par une démyélinisation, ce qui engendre une dégénérescence irréversible des axones et une perte des neurones, entraînant de graves atteintes neurologiques pour les patients. En effet, les lésions observées dans la SEP empêchent la bonne conduction de l'influx nerveux par les neurones et sont responsables des différents symptômes de la maladie tels que les troubles moteurs ou visuels.

Afin de mieux comprendre et caractériser la SEP, des modèles animaux recréant les symptômes de la maladie ont été mis au point. L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est le modèle animal utile d'étude de la SEP.

Dans ce projet nous nous proposons donc de tester de nouvelles approches pour le traitement de l'EAE chez la souris. Dans ces approches, nous nous baserons sur des molécules issues de l'industrie pharmaceutique, ainsi que sur des techniques de thérapie cellulaire basées essentiellement sur l'ingénierie des lymphocytes T, acteurs majeurs de l'inflammation au cours de l'EAE. L'efficacité de cette technique de thérapie cellulaire a déjà été prouvée dans d'autres types de pathologies, notamment le cancer.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 4 600 animaux sur 5 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. Ce projet a déjà obtenu l'accord du comité d'éthique régional en 2012, et les études effectuées auparavant 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'acquiescer 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.

7279. La mortalité par cancer représente un quart des causes de mortalité en Europe. Plus de 350 000 nouveaux cas de cancer sont détectés en France chaque année (plus de 200 000 hommes et de 150 000 femmes, Institut National du Cancer, INCA), Plus de 85 000 hommes and 60 000 femmes meurent chaque année du cancer en France, ce qui en fait la première cause de mortalité masculine et la deuxième cause de mortalité féminine.

Toutes les tumeurs solides se développent à partir d'un petit groupe de cellules malignes en une tumeur macroscopique visible. L'angiogenèse, ou croissance de nouveaux vaisseaux capillaires, artériels et veineux, est une étape critique de cette transition vers une tumeur organisée macroscopique, étape considérée comme une caractéristique essentielle du processus cancéreux. L'angiogenèse est un processus complexe impliquant plusieurs types cellulaires dans le vaisseau et des cellules dérivées de la moelle osseuse. Même si plusieurs modèles *in vitro* simplifiés existent pour décrire une partie de ce processus (cultures de cellules endothéliales par exemple), ils ne peuvent récapituler l'ensemble des interactions cellulaires prenant place *in vivo*. Pour pouvoir étudier de nouvelles cibles pharmacologiques pour le contrôle de l'angiogenèse tumorale, il est essentiel de disposer de modèles pathophysiologiques intégrés récapitulant l'intégralité de ce processus.

Notre projet utilise des modèles de croissance tumorale chez la souris, pour leur similitude avec les processus cancéreux chez l'homme et l'existence de modèles génétiques murins permettant de modifier spécifiquement dans les cellules endothéliales des vaisseaux l'expression de plusieurs gènes. Ces gènes sont des cibles potentielles pour le contrôle de l'angiogenèse et de la croissance tumorale qui en dépend. Notre projet prévoit l'étude de l'effet d'une inactivation ou d'une surexpression ciblée ou constitutive de trois de ces cibles, sur l'angiogenèse en général, et sur des modèles de croissance tumorale.

Dans un souci de remplacement, seules les cibles préalablement validées dans des modèles *in vitro* seront utilisées. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le nombre d'animaux pour chaque expérience sera limité à celui nécessaire à la validation d'un effet significatif. Par ailleurs, le projet sera conduit en plusieurs étapes conditionnelles, dans lesquelles seule l'obtention de résultats pour un premier type de tumeur conduira à la réalisation de l'ensemble des expériences associant les modèles tumoraux complémentaires. Dans un souci de réduction, les mêmes animaux seront utilisés à la fois pour les études de croissance tumorale et la réalisation des analyses histologiques et moléculaires. Ce projet utilisera au maximum 1440 souris adultes. Dans un souci de raffinement, des points limites précoces et adaptés à chaque modèle tumoral seront évalués quotidiennement pour limiter autant que possible la souffrance potentielle des animaux.

7280. CD146 est une protéine de la jonction endothéliale impliquée dans le maintien de l'intégrité vasculaire, en contrôlant notamment l'infiltration de produits sanguins dans les tissus sous-jacents. Grâce à un protocole expérimental précédemment accepté, nous avons mis en évidence un rôle majeur de CD146 dans la progression de l'athérosclérose et de la péritonite. L'expression de CD146 n'étant pas restreinte aux cellules endothéliales mais retrouvée également sur les péricytes et les leucocytes, il est utile de connaître la contribution du CD146 non endothélial dans ces pathologies. Pour cela, nous utiliserons des souris chimériques qui expriment CD146 dans leurs vaisseaux mais qui n'expriment pas CD146 sur leurs cellules circulantes. Dans une optique de stratégie thérapeutique, il est nécessaire de mieux cibler CD146 et d'étudier le rôle du CD146 porté spécifiquement par les leucocytes dans ces pathologies grâce à l'utilisation de modèles chimériques. Afin de respecter les règles d'éthique, la règle des « 3R Réduction/Remplacement/Raffinement » sera appliquée. Réduire le nombre d'animaux utilisé consistera à se limiter aux seules expériences absolument indispensables et à tenir compte des statistiques obtenues précédemment lors de la conception du protocole expérimental pour une estimation préalable du nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le concept de raffiner, autrement dit optimiser l'expérimentation, concerne la méthodologie appliquée aux animaux dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux. Ainsi, le

protocole sera planifié correctement afin d'éviter les perturbations susceptibles de limiter l'expérience et de plus, il sera établi des points limites les plus précoces possible en fonction de l'objectif de l'expérimentation. Enfin, chaque fois que cela sera possible le modèle *in vivo* sera remplacé par des modèles *in vitro* ou "*in silico*" (modèles mathématiques, bio-informatique). Puis, nous utiliserons le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de tests statistiques selon les résultats obtenus dans un protocole précédemment accepté, soit un total de 180 souris. Le protocole sera arrêté si l'animal présente des difficultés à respirer (visualisées par une augmentation des rythmes cardiaque et respiratoire répercutée au niveau des flancs de l'animal), si l'animal est prostré ou en retrait, si ses poils sont hérissés. De plus, la douleur et la souffrance seront évaluées lors des protocoles et durant toute la vie de l'animal de la naissance à la mort grâce à une grille d'évaluation de la douleur et nous agirons en conséquence. Les animaux disposent de « nestlets », qui sont des nids végétaux à base de fibres courtes de coton, utilisés comme enrichissement de l'environnement et matériau de nidification, ainsi que de tunnels afin de réduire l'ennui et de diminuer le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité à l'animal.

7281. Les poissons petits pélagiques représentent un enjeu économique très important pour les pêcheries méditerranéennes. Depuis 2008, les stocks d'Anchois et de sardines de Méditerranée ont subi des changements drastiques avec une perte de biomasse et une évolution brutale dans la structure en âge et en taille de la population, entraînant une diminution très nette des captures françaises. Des travaux récents montre que la diminution de la biomasse résulterait d'une baisse conjointe de la croissance et de la condition corporelle des anchois et des sardines, et non d'une baisse d'abondance. Ce changement semble pointer vers un défaut d'alimentation de ces espèces qui se traduirait par une surmortalité préférentielle des classes d'âges les plus élevées. Cette surmortalité ne semble ni liée à la pêche, ni liée à une pression de prédation importante que ce soit de la part des thons rouges ou des mammifères marins. Ces premiers travaux ont donc mené à la réévaluation du stock de sardines du Golfe du Lion, qui est maintenant reconnu en déséquilibre écologique. L'hypothèse alimentaire ainsi que la relation proies/dynamique de la population de ces petits pélagiques n'ont toutefois pas encore été démontrées. Le présent projet correspond à la phase 1 de travaux dont l'objectif global sera de tester l'hypothèse d'un contrôle de ces espèces par les niveaux trophiques inférieurs. A cette fin, le projet dans sa phase 2 couplera une approche *in situ* d'analyses de séries temporelles de plancton et de petits pélagiques et une approche expérimentale permettant de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu et les traits de vie affectés par les conditions environnementales (proies, température). La phase 1, objet de la présente demande d'autorisation de projet, porte sur la définition des meilleures conditions de capture, de transport et d'acclimatation à la captivité d'une de ces espèces (la sardine, *Sardina pilchardus*). En effet, jusqu'à maintenant très peu d'essais de captures vivantes et maintiens en captivité ont été menés pour cette espèce et son acclimatation nécessite donc des mises au point. Les travaux permettront également de définir des méthodes spécifiques (biométrie et/ou analyse d'image) de collecte de données sur ces animaux. Enfin, des premiers essais d'alimentation à base de proies vivantes permettront de calibrer une méthodologie expérimentale. Pour cela, les animaux seront capturés en milieu naturel lors d'une pêche unique et ensuite acclimatés et maintenus en bassins expérimentaux. Un total de 600 sardines est visé afin de pouvoir mener à bien les différentes expériences, ainsi que de maintenir autant que possible un comportement « naturel » de banc qui diminuera le stress des individus. La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet de la façon suivante : 1) le Remplacement n'est pas possible dans ces expériences puisque le but est de comprendre comment maintenir cette espèce en particulier en captivité ; 2) la réduction a été prise en compte au niveau de la pêche en adaptant les techniques et zones de pêche pour limiter au maximum le nombre d'individus affectés par cette pêche aux seuls individus capturés ; et 3) le raffinement comprendra l'optimisation des conditions d'élevage pour cette espèce (nombre d'individus suffisants pour être en bancs, utilisation de bassins de volumes et hauteurs d'eau importants, etc.) ainsi que la réalisation des différentes manipulations (mesures et marquage) sous anesthésie.

7282. La daurade royale (*Sparus aurata*) est une espèce côtière de premier plan en Méditerranée française, tant pour l'importance de son exploitation, sa valeur commerciale et son aquaculture, que pour ses aspects emblématiques dans la région. Aujourd'hui concernée par les plans de gestion des petits métiers en Méditerranée, de nombreux aspects de son cycle de vie restent pourtant inconnus, limitant la capacité des scientifiques à fournir un appui aux gestionnaires. Les lagunes méditerranéennes sont particulièrement importantes dans le cycle de vie de cette espèce migratrice mais sa dynamique spatiale en relation avec les caractéristiques de l'habitat reste inconnue. Ce projet vise dans sa phase I (présente demande d'autorisation) à tester les dernières techniques de marquage pour lever les verrous techniques indispensables à la mise en place d'un programme régional de plus grande échelle pour étudier les migrations des Daurades et leur utilisation des différents habitats côtiers (phase II qui fera l'objet d'une nouvelle demande d'autorisation). Pour ce faire, le présent projet vise à tester sur des animaux d'élevages (N=150) les techniques de

-Marquage sous cutané (puce électronique) = identification individuelle

-Marquage externe de type spaghetti (étiquette) et tatouage = identification individuelle

-Marquage interne (implantation de marques acoustiques factices) pour tester la faisabilité technique de mettre en place un projet de suivi acoustiques (avec de vrais marques) d'individus sauvages avec de vrai marques acoustiques

-Marquage sous-cutané (implantation de mini capteurs physiologiques) = Développement de nouvelles marques

Les méthodes retenues seront alors testées sur des animaux sauvages capturés par les pêcheurs professionnels (N=50). Afin d'optimiser le protocole, nous avons suivi la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) :

- Remplacer : il est impossible dans le cadre de cette protocole ciblant la Daurade Royale de remplacer cette espèce par un autre modèle, l'intérêt du projet étant justement de regarder l'impact sur cette espèce

- Réduire : le nombre d'individus testés dans les différents lots et procédures est minimal compte tenu de la nécessité d'avoir des significativités statistiques. De plus, pour réduire le nombre d'individus, seul le Lot 1 fera l'objet de tests statistiques (donc d'un



nombre d'individus plus importants), les lots 2 et 3 feront l'objet que d'une validation des résultats du lot 1 sur des individus plus gros (Lot 2) et sauvages (Lot 3).

- Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux par des procédures d'anesthésie optimales. En dehors des phases opératoires, les poissons seront conservés, à des densités optimales, dans des bassins isolés des perturbations humaines, à l'air libre, à l'ombre ; ils seront nourris au granulé "BIO" et la qualité de l'eau de leur bassin sera suivie quotidiennement (T°, S°, PH et PO2) pour prévenir toute phase de stress liées à l'environnement

7283. Les troubles de la statique pelvienne, plus couramment appelé prolapsus génital, correspondent à un défaut de soutien des 3 étages, urinaire, gynécologique et digestif du plancher pelvien et définissent la descente des organes pelviens dans le vagin voire une extériorisation de ceux-ci à travers l'orifice vulvo-vaginal. Il s'agit d'un problème de santé publique touchant près d'une femme sur trois tous âges confondus, et responsable d'une altération de la qualité de vie de celles-ci.

La prise en charge initiale d'un prolapsus génital s'appuie sur la rééducation pelvi-périnéale. Mais lorsque l'atteinte est sévère ou en cas de récurrences malgré la prise en charge médicale, un recours à une approche chirurgicale est nécessaire.

Actuellement le matériel de référence pour la fabrication des prothèses de renforcement en clinique humaine est le polypropylène (PPL), organisé en fils puis en treillis, qui est un matériau non résorbable. La prothèse implantée devient un support mécanique et permet de renforcer le diaphragme pelvien défaillant. Ainsi depuis plusieurs années, des études ont ramenées des résultats très satisfaisants pour l'utilisation de ces dispositifs.

Son intégration est fonction du matériau utilisé (matière, conformation, épaisseur, porosité), du site et de la technique d'implantation. Cependant suite à l'implantation de ces prothèses, il est relevé dans la littérature de nombreux effets indésirables liés à la pérennité de la fixation et à des problèmes d'intégration tissulaire.

La réflexion à propos des récurrences et des complications dans le traitement du prolapsus avec mise en place de prothèses synthétiques a conduit les opérateurs à s'interroger sur les indications opératoires, les techniques de pose et le type de matériau utilisé et il apparait donc essentiel de pouvoir visualiser chez les patientes ces prothèses synthétiques.

Malheureusement, ces prothèses ne sont pas visualisables par des techniques usuelles d'imagerie médicale. L'objectif de ce projet est de rendre ces prothèses visibles en IRM (méthode de choix pour les cliniciens) afin que l'on puisse identifier en post-opératoire les causes chirurgicales de ces effets indésirables.

Après avoir développé une technique de greffage de surface d'agent de contraste IRM permettant la visualisation *in vitro* de ces prothèses, l'objectif désormais est d'évaluer la visualisation de ces prothèses dans un modèle animal. Pour le choix du modèle animal, nous avons identifié dans la littérature la brebis et le chimpanzé qui possèdent une structure anatomique de l'appareil urogénital voisine de l'être humain. Cependant, pour des raisons de faisabilité, de réglementation et de coût, nous avons choisi un modèle d'implantation intramusculaire en localisation dorsale chez le rat de façon à se mettre dans une localisation anatomique comparable à celle de l'application clinique finale.

La finalité de cette première étude *in vivo* est d'étudier la pérennité de la visualisation sur une période de 2 mois (temps minimal pour les cliniciens dans le cadre de la prise en charge des complications post-opératoires)

Pour cela nous prévoyons 4 rats dans lesquels seront implantées les prothèses dans les loges musculaires au niveau dorsal. Les prothèses modifiées et visibles en IRM *in vitro* seront implantées dans la loge droite et les prothèses commerciales non modifiées le seront dans la loge gauche. Pour évaluer la pérennité de la visualisation en IRM, 2 rats seront euthanasiés à 15 jours et 2 mois. Ces deux temps permettront d'évaluer s'il est possible d'obtenir une visualisation dans un temps très court après l'implantation et si cette visualisation est pérenne sur un temps adapté à l'application.

Pour mettre en place cette étude, nous nous sommes entourés d'un chirurgien gynécologue, d'un spécialiste de l'expérimentation animale et d'un spécialiste de l'IRM.

Etant donné que cette étude a uniquement pour objectif de montrer que la visualisation en IRM dans un modèle animal est possible et ce sur une période de courte durée (< à 2 mois), il nous semble opportun de réduire le nombre d'animal à 2 par temps. Ceci est pensé en cas de décès d'un animal lors de la procédure chirurgicale.

En plus de cette considération sur le nombre de rats à utiliser, des attentions seront portées au bien-être des animaux. En effet, lors de la procédure chirurgicale, en plus de l'anesthésie générale, une anesthésie locale sous cutanée sera réalisée avant incision des tissus afin de diminuer la douleur liée à l'opération. Les animaux seront surveillés quotidiennement dans les suites post opératoires. L'observation a pour but de détecter une anomalie du comportement (apathie, prostration) et/ ou physique (altération sévère de l'état général, amaigrissement de plus de 15%, cicatrisation cutanée défectueuse avec éviscération ou lâchage de suture gênant la mobilisation ou entraînant des douleurs) pouvant témoigner d'une souffrance physique faisant établir un point limite au protocole. Dans ce cas une euthanasie précoce sera réalisée.

De plus, le milieu de stabulation sera enrichi par des tubes cartonnés (cell tube) qui permettent une activité physique quotidienne et diminue l'agressivité et le stress de l'animal.

En fonction des résultats obtenus lors de cette pré-étude, nous proposerons une étude plus approfondie intégrant à la fois une étude statistique et une prise en compte de l'intégration tissulaire. En effet, si les prothèses ne sont pas visualisables *in vivo*, il n'y a aucun intérêt à utiliser des rats pour un autre objectif que la visualisation.

7284. La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie (animale telles qu'un être humain, végétale, fongique, bactérienne), qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties (ex : foie, rein, poumon, etc. chez l'animal).

Le toxicologue s'intéresse aux effets directs et indirects, immédiats et différés, à fortes et faibles doses, en exposition aiguë, sub-chronique ou chronique, d'une substance ou d'un mélange (effet "cocktail") sur les conditions externes et leurs effets délétères sur les communautés et organismes vivants, sur les organes, tissus, cellules ou organites et sur les gènes et la reproduction.

La dose maximale tolérée ou DMT correspond à la dose qui, administrée en aigu par voie intraveineuse, intrapéritonéale ou orale, ne provoque pas plus de 50% de mortalité des animaux traités, pas de forte perte de poids (25% par rapport au poids maximum des animaux) ou des modifications importantes du comportement (agressivité, cachexie, hyperactivité, somnolence, salivation, lacrymation, tremblements...). Cette dose est exprimée en poids de substance testée par poids d'animal (mg/kg). L'étude de la DMT est réalisée en deux phases :

- la première phase de l'étude consiste en une administration unique par voie intraveineuse dans une veine caudale du composé à évaluer sur des groupes de 3 souris femelles, les femelles étant considérées comme plus sensibles que les mâles. Si aucune information n'est connue sur la gamme de doses du composé pouvant être testées, la première dose testée est la dose maximale ou dose limite correspondant à la limite de solubilité du composé en solution (dénommée HSD pour "Highest Soluble Dose" en anglais). Si cette dose ne se révèle pas létale pour au moins 50% des animaux ou si moins de 50% des animaux présentent une perte de poids supérieure à 25% ou des modifications de comportement importantes pendant les 14 jours de suivi, le composé est considéré comme non toxique après administration en aigu à cette dose limite et l'étude est terminée. Si par contre un effet toxique est observé à cette dose limite, il est nécessaire de poursuivre les expérimentations avec la seconde phase de l'étude.

- la seconde phase de l'étude consiste en la détermination précise de la DMT du composé à évaluer. Des doses de concentrations inférieures sont administrées à des groupes de 3 souris femelles en débutant aux doses correspondants à 0,5 fois la HSD (0.5xHSD), 0,1xHSD et 0,05xHSD. En fonction des effets sur la mortalité, l'état physiologique et le comportement des animaux, les doses du composé à évaluer sont augmentées ou diminuées pour les groupes suivants afin de déterminer précisément la DMT du composé à évaluer. Un maximum de 9 doses du composé à évaluer sont ainsi testées.

L'objet de ce projet d'une durée de 4 mois et donc de déterminer la DMT de 2 composés, candidats médicaments pour le traitement de différentes formes de cancer, administrés par injection intraveineuse en traitement unique. Un total maximum de 72 souris sera nécessaire pour la réalisation de ce projet.

La première phase nécessitera 9 souris réparties en 3 groupes de 3 souris : un groupe traité avec le véhicule de mise en solution des 2 composés et 2 groupes traités avec les 2 composés à tester à la HSD. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement au cours des 14 jours suivants l'injection des composés testés ou du véhicule. Si aucune mortalité directe (dans les heures suivant l'injection) ou retardée (au-delà de 24 heures après injection), aucune perte de poids importante ou aucune modification importante du comportement n'est observée, nous n'aurons pas à utiliser d'animaux supplémentaires, l'étude sera terminée.

Dans le cas contraire, en cas d'effets toxiques d'1 ou des 2 composés testés, 36 à 63 animaux supplémentaires seront nécessaires pour déterminer de manière plus précise la DMT de l'1 ou des 2 composés testés : 3 séries expérimentales de 12 souris seront alors utilisées avec pour chacune un groupe de 3 souris traité avec le véhicule et 3 groupes de souris traités avec 3 doses différentes de l'1 ou des 2 composés à tester. Ces animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement au cours des 14 jours suivants l'injection des composés testés ou du véhicule.

Les souris seront placées à jeun la veille de l'injection des 2 composés à tester et du véhicule et elles seront placées sous anesthésie gazeuse pour effectuer les injections intraveineuses.

A l'issue des 14 jours de suivi, les animaux seront euthanasiés par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique et une observation macroscopique de l'ensemble des organes sera effectuée en comparant l'aspect des organes (forme, taille et couleur) entre les souris traitées avec le véhicule et les souris traitées avec les 2 composés à tester pour la ou les doses évaluées.

Ces études de toxicité aiguë ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives. Elles sont effectuées sur un nombre réduit d'animaux préalablement à la réalisation d'études d'efficacité chez l'animal afin de déterminer la dose maximale tolérée pouvant être utilisée sans induire de mortalité et donc sans remettre en cause les résultats de futures études (raffinement).

7285. Avec plus de 40 000 nouveaux cas et 17.000 victimes par an, le cancer colorectal (CCR) est la plus fréquente des tumeurs malignes et la deuxième cause de décès par cancer en France. Si la survie relative à 5 ans est de 57 %, le pronostic est étroitement lié au stade auquel le cancer est diagnostiqué. Notamment, elle n'est que de 5 % en cas de cancer métastatiques malgré l'amélioration de la chirurgie, des chimiothérapies et des thérapies ciblées. A ce jour, la chirurgie et des cocktails de chimiothérapies systémiques (5-fluorouracile, l'irinotécan, et l'oxaliplatine) visant uniquement les cellules tumorales en prolifération demeurent la pierre angulaire du traitement des CCR métastatiques. Cependant, l'efficacité de ces traitements est fortement entravée par l'apparition fréquente de la résistance aux médicaments et la récurrence tumorale. La compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la récurrence tumorale a connu un essor important avec la découverte de l'existence des cellules souches cancéreuses (CSC) dans de nombreux cancers, incluant le cancer du côlon. Des données récentes montrent que ces CSC résisteraient aux thérapies conventionnelles et seraient à l'origine de l'apparition de métastases et de la récurrence tumorale. Nous avons préalablement montré que le récepteur nucléaire PXR (NR1I2) conférait aux cellules tumorales humaines une augmentation de la résistance aux chimiothérapies. Nos derniers travaux montrent que cette voie de régulation est exacerbée dans les CSC, suggérant que PXR pourrait être un « interrupteur moléculaire » anormalement activé au sein des CSC, ce qui potentialiserait leur résistance source de récurrence tumorale. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous voulons évaluer l'effet de deux inhibiteurs pharmacologiques de PXR sur le potentiel d'échappement aux chimiothérapies et d'initiation tumorale des cellules souches cancéreuses coliques. Pour mener à bien notre projet, nous réaliserons des injections de cellules tumorales obtenues à partir de biopsies de patients dans des souris immunodéprimées (n=108) afin de déterminer les effets des inhibiteurs de PXR comme stratégie néo-adjuvante, en association avec une chimiothérapie classique à base de 5FU et d'irinotécan. Afin de respecter les principes des 3Rs (Réduire, Raffiner et

Remplacer), nous avons : i) réduit au minimum le nombre d'animaux requis pour ces expériences originales qui ne peuvent pas être réalisées autrement que sur la souris immunodéprimée, sans que cela se traduise par l'obtention de résultats moins fiables. ii) évalué les souffrances subies par les animaux (injections de cellules tumorales en sous-cutanée, injections de chimiothérapies et des inhibiteurs pharmacologiques de PXR, et euthanasie afin de minimiser la douleur subie par les animaux et d'identifier les critères d'interruption. iii) optimiser les procédures expérimentales afin de réduire l'inconfort subie par les animaux tout en optimisant les informations obtenues, via notamment la mise en de procédures de remplacement par des modèles *in vitro* afin de confirmer et de renforcer les résultats obtenus.

7286. Les troubles de la mémoire sont fréquents au cours du vieillissement ainsi que dans des pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, pourtant il n'existe pas de traitement réellement efficace. Ces 10 dernières années, de nombreux travaux ont mis en évidence des récepteurs dans le cerveau que l'on peut cibler avec des substances pharmacologiques pour améliorer la mémoire : les récepteurs 5-HT6 (5-HT6R) de la sérotonine. Certaines de ces substances sont actuellement testées chez l'Homme en essais cliniques. Cependant, les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques de ces composés ne sont pas connus. Afin d'approfondir les connaissances de ces mécanismes, nous souhaitons étudier les effets de différentes substances qui modulent l'activité de ces récepteurs 5-HT6, sur l'activité cellulaire, sur l'activation cérébrale (par imagerie par résonance magnétique), et sur le comportement. Ce projet sera réalisé chez le rongeur (souris et rat) dont le système nerveux central présente de nombreuses analogies avec celui de l'Homme et qui présente par ailleurs de bonnes capacités de mémorisation. Aucune méthode non animale ne peut être utilisée pour atteindre les objectifs de ce projet. *In fine*, nous pourrions connaître les effets de ces produits sur le fonctionnement des neurones, sur le fonctionnement du cerveau et sur les performances de mémoire. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet est estimé à 594 (378 souris et 216 rats). Ce nombre a été réduit au minimum sur la base de données acquises précédemment au laboratoire. Le projet sera réalisé en deux parties : une première partie avec des souris et des rats jeunes adultes (âgés d'environ 3 mois), puis, une seconde partie avec des souris et des rats âgés (20 mois et 18 mois respectivement). Les animaux subiront soit des tests de comportement après injection des différentes substances modulant l'activité des 5-HT6R, soit une anesthésie afin d'acquérir des données d'activation cérébrale par IRM, suivie directement d'une euthanasie. Dans un souci de raffinement, le bien-être des animaux sera assuré par du personnel compétent qui les surveillera quotidiennement. De plus, au cours de chaque procédure expérimentale de ce projet, la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux seront réduites (anesthésie, soins post-opératoires, manipulation par du personnel expérimenté). Enfin, des points limites sont établis pour stopper les procédures expérimentales en cas de souffrance de l'animal.

7287. Le microbiote intestinal, ensemble des bactéries qui peuplent notre tube digestif, est constitué de plusieurs centaines d'espèces et est spécifique de chaque individu. Récemment, il a été révélé l'implication potentielle de ce microbiote dans l'obésité. Ainsi, les souris axéniques (dépourvues de microbiote intestinal) sont résistantes à une obésité induite par un régime riche en lipides. Si les mécanismes reliant bactéries intestinales et obésité sont encore peu connus, des espèces bactériennes potentiellement impliquées ont été identifiées. Ainsi, la bactérie B29, issue du microbiote d'un patient atteint d'obésité morbide, est capable à elle seule d'induire une obésité chez des souris. A l'inverse des bactéries probiotiques du genre *Lactobacillus* ont montré des propriétés anti-obésité chez la souris.

Cette étude vise à déterminer si une espèce bactérienne probiotique peut réduire le développement de l'obésité induite par la bactérie B29. Nous utiliserons ainsi un groupe de souris axénique (sans microbiote), un groupe de souris axénique associé à la bactérie B29, un groupe de souris axénique associé à la bactérie probiotique, et un groupe de souris axénique associé à la bactérie B29 et à la bactérie probiotique.

L'ensemble des souris recevra un régime riche en lipides. Nous comparerons le développement de l'obésité chez tous les groupes de souris.

Le projet, portant sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 48 animaux. Les souris n'auront comme seul traitement une alimentation spéciale constituée à 60% de lipides. Elles seront pesées de façon hebdomadaire. Durant l'expérimentation nous collecterons des fèces. Le dernier jour avant l'euthanasie nous ferons un test de tolérance au glucose sur l'ensemble des animaux de ce protocole (mesure de la glycémie sanguine).

Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalín (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les souris seront 2 par cage pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

7288. L'objectif de ce projet est de mettre en place le modèle orthotopique tumoral glioblastome (cancer du cerveau) afin d'évaluer l'efficacité de vecteurs oncolytiques pour cette pathologie.

En préalable, ces vecteurs ont montré des capacités à lyser les cellules *in vitro*.

Suite à l'injection des cellules tumorales dans le cerveau, par intervention chirurgicale sous anesthésie générale, les souris vont développer des tumeurs au site d'injection mimant ainsi de façon pertinente la réalité clinique humaine.

Après prise tumorale, les virus oncolytiques, en combinaison ou non avec des chimiothérapies, seront injectés dans les souris (par voie intraveineuse ou directement dans la tumeur) et l'effet thérapeutique sera évalué par analyse de survie. La Dose Létale 50 (DL50) de plusieurs virus oncolytiques injectés directement dans le cerveau sera préalablement évaluée.

Afin de limiter la souffrance des animaux des produits analgésiques et anti-inflammatoires sont injectés en post-opératoire. Les effets secondaires dus à l'évolution des tumeurs ainsi qu'à l'injection des virus et de la chimiothérapie seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable.

Le nombre d'animaux par groupe expérimental se situe entre 5 et 20 animaux selon le type de procédure qui seront répétées au maximum quatre fois afin de confirmer les résultats obtenus.

Le nombre maximum de souris envisagé pour ce projet avec ces hypothèses est de 1540.

7289. Les cancers du pancréas, de l'ovaire et de la vessie font partie des cancers majeurs entraînant le décès annuel en France d'environ 10000, 4000 et 5000 sujets, respectivement. L'objectif de ce projet est de mettre en place différents modèles orthotopiques tumoraux afin d'évaluer l'efficacité de vecteurs oncolytiques pour ces trois pathologies.

En préalable, ces vecteurs ont montré des capacités à lyser les cellules *in vitro*.

Suite à l'injection des cellules tumorales de différentes origines tissulaires dans les organes correspondants, les souris vont développer des tumeurs au site d'injection mimant ainsi de façon pertinente la réalité clinique humaine.

Après prise tumorale, les virus oncolytiques, en combinaison ou non avec des chimiothérapies, seront injectés dans les souris et l'effet thérapeutique sera évalué soit par analyse de survie, soit par analyse de la taille tumorale.

Les effets secondaires dus à l'évolution des tumeurs ainsi qu'à l'injection des virus et de la chimiothérapie seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux.

Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable.

Le nombre d'animaux par groupe expérimental est de 10 pour les expériences de mises au point des modèles. Chaque expérimentation sera au maximum quadruplée afin de confirmer les résultats obtenus.

Le nombre maximum de souris envisagé pour ce projet avec ces hypothèses est de 4840.

7290. L'objectif de ce projet est d'étudier l'évolution des volumes sanguins et gazeux pulmonaires, au cours du cycle respiratoire, dans un modèle d'asthme sévère chez le lapin sous ventilation mécanique. La constriction des bronches, mécanisme principal de l'asthme, entraîne des altérations régionales dans le rapport entre la ventilation et la perfusion pulmonaires, provoquant une diminution de la concentration de l'oxygène dans le sang. La ventilation mécanique est un moyen thérapeutique de choix qui vise à maintenir l'oxygénation sanguine et la fonction respiratoire chez le patient présentant une crise d'asthme grave. Cependant, l'impact des réglages de ventilation mécanique sur la fonction pulmonaire régionale ne sont pas connues.

L'intérêt scientifique de ce projet est de mieux comprendre comment la ventilation et la perfusion pulmonaires changent au cours du cycle respiratoire, sous ventilation mécanique, au cours d'une crise d'asthme aiguë sévère. Aucune approche non animale n'existe pour atteindre les objectifs de notre projet impliquant de le réaliser *in vivo*. Nous avons mis au point une technique d'imagerie qui utilise des rayons X produits par un accélérateur de particules, qui permet une mesure quantitative du volume gazeux et sanguin dans le poumon, et ses variations au cours du cycle respiratoire. Le but du présent projet est d'utiliser cette technique afin de décrire ces variations dans un modèle d'asthme sévère induit chez 20 lapins anesthésiés et sous ventilation mécanique, et d'évaluer les modes ventilatoires et les réglages de ventilation mécanique qui permettent d'améliorer le rapport entre la ventilation et la perfusion. Ce dernier détermine directement l'oxygénation sanguine. Les connaissances issues de cette expérience ont une importance pour le patient car elles permettront de mieux régler la ventilation mécanique des patients en situation d'insuffisance respiratoire dans un contexte de crise d'asthme aiguë sévère. Toutes les mesures seront prises afin de réduire la souffrance des animaux, notamment en maintenant des conditions de stabulation (température, lumière, densité de population, alimentation) optimales ; en instaurant une sédation avant l'induction de l'anesthésie générale ainsi qu'une antalgie efficace. Tous les animaux seront euthanasiés par surdose d'anesthésique à la fin de l'expérience (méthode réglementaire).

7291. La maladie de Parkinson est liée à la dégénérescence d'un sous-groupe de neurones dopaminergiques dans le cerveau. Elle est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente avec 6 500 000 de malades dans le monde et 1 à 2 % de la population de plus de 65 ans touchés. La maladie se manifeste par une akinésie, des tremblements, une rigidité et une instabilité posturale.

Actuellement, le traitement de la maladie de Parkinson s'effectue par la prise de L-Dopa par voie orale. Son administration est donc pulsatile et entraîne des complications motrices très invalidantes avec une fréquence élevée de 50 % à 5 ans et 80 % à 10 ans ; ceci en raison de sa demi-vie très courte et de la dégénérescence évolutive des neurones qui ne peuvent plus assurer le stockage de la dopamine, rendant le patient directement dépendant des administrations per os. Par ailleurs, une exposition systémique à la L-Dopa et aux inhibiteurs associés peut avoir des effets secondaires majeurs.

A l'heure actuelle, il existe plusieurs options thérapeutiques aux complications motrices liées à la L-dopa, basée sur l'administration continue d'un agoniste en systémique ou la stimulation cérébrale profonde. Mais ces stratégies sont soit moins efficaces, soit concernent uniquement un petit sous-groupe de patient, et/ou ont une ergonomie faible avec des complications. Nous proposons donc une solution alternative qui consiste à administrer de faibles doses de dopamine en continu directement dans le cerveau des malades. La faisabilité de ce concept a déjà été étudiée dans notre équipe avec un modèle de souris de la maladie de Parkinson sur une durée d'une semaine. Nous voudrions maintenant poursuivre cette étude dans un modèle différent pour vérifier d'une part, l'efficacité dans un autre modèle, mais aussi la tolérance et l'absence d'effets secondaires sur une durée de traitement plus longue. Dans ce projet, nous aurons besoin de 689 rats Wistar sur 5 ans. Pour limiter l'utilisation d'animaux, l'étude de la potentielle toxicité, des mécanismes d'action et de protection de la dopamine sont étudiés en parallèle sur un modèle cellulaire (Remplacement). De la même façon, les animaux qui reçoivent le traitement seront aussi utilisés pour étudier l'efficacité sur les symptômes moteurs, l'imagerie cérébrale *in vivo* et pour l'étude histologique post-mortem de l'effet du traitement (Réduction). Par ailleurs, un suivi quotidien des animaux est effectué pour surveiller l'apparition éventuelle de souffrance ou de points limites pour lesquels des décisions adaptées seront prises (Raffinement).

7292 Les étudiants de l'école vétérinaire reçoivent un enseignement de physiologie digestive.

Les travaux pratiques « motricité digestive » pour but d'illustrer l'enseignement théorique.

Lors des TP sur le mouton, le réticulo-rumen (RR) est plus particulièrement exploré. (16 séances par an de septembre à décembre). Après une première étape d'auscultation du RR chez des moutons sains, deux molécules sont administrées aux moutons afin d'en explorer et d'en discuter les effets.

Un mouton reçoit de l'atropine par voie IV. Les étudiants auscultent ensuite le RR et doivent percevoir un arrêt des contractions.

Un mouton reçoit de la romifidine (un sédatif commercialisé à usage vétérinaire) par voie IV. Les étudiants auscultent ensuite le RR et doivent percevoir un arrêt des contractions. Deux prélèvements sanguins sont aussi réalisés sur ce mouton afin de démontrer l'effet hyperglycémiant de la romifidine.

Du glucose est administré à un troisième mouton par voie orale. La glycémie de ce mouton est ensuite suivie au cours du temps. Cette expérience, également menée chez le chien (cf saisine correspondante), permet aux étudiants de comparer les mécanismes de digestion/absorption du glucose chez ces 2 espèces.

6 moutons par an seront utilisés pour ce TP programmé pour 5 ans. Les mêmes moutons pourront être utilisés plusieurs années si le vétérinaire référent donne son accord. Du fait de sa vocation pédagogique pour de futurs vétérinaires, cette étude ne peut se concevoir que chez l'animal vivant et en bonne santé. Les moutons sont hébergés dans les meilleures conditions requises (en troupeau dans une bergerie standardisée, avec accès quotidien libre au pré...) et une observation quotidienne par des personnels qualifiés, leur assurant les meilleures conditions de vie et de bien-être.

7293. L'objectif de ce programme est d'évaluer, chez la caille, la contribution de phénomènes épigénétiques à la variabilité des caractères, et d'estimer la variabilité des marques épigénétiques et de leur transmission entre générations. Ce programme est découpé en deux étapes, pour réduire le nombre d'animaux étudiés dans la seconde phase. Une première phase a pour but de tester l'influence de 3 agents modificateurs de marques épigénétiques sur les performances et la méthylation de l'ADN de leurs descendants. Quatre lignées de cailles seront utilisées, les plus consanguines possible afin de limiter la variabilité génétique interindividuelle, et donc réduire le nombre d'animaux étudiés, qui s'élève dans cette première phase à 2000 individus (400 fondateurs et 1600 descendants). Seul l'agent révélant la plus grande variabilité de réponses au sein des lignées sera conservé pour la deuxième phase. Celle-ci consistera à quantifier l'influence de l'agent à travers les générations. Nous comparerons, entre lignées, la persistance des modifications de certaines marques épigénétiques, avec un effectif de 4800 animaux. L'ensemble du programme utilisera 6800 animaux.

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

Réduire : des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience. Raffiner : Pour ce programme, nous avons choisi de tester le modificateur de méthylation par injection dans l'œuf avant incubation, de façon à ne pas générer de mal-être chez l'animal sur pieds. Ceci constitue un "raffinement" de l'expérience, l'alternative consistant à effectuer une carence alimentaire chez les parents des animaux analysés. Les marques épigénétiques étant susceptibles d'être modifiées en fonction de l'environnement, il est crucial pour la fiabilité des résultats que les animaux soient élevés dans les meilleures conditions possibles, en évitant toute perturbation susceptible d'affecter leur bien-être. Dans cette optique, aucune méthode invasive ne sera utilisée, et la prise de sang, nécessaire aux analyses de méthylation, sera réalisée dans le strict respect des conditions de bien-être des animaux.

Remplacer : L'objectif principal de l'étude étant d'évaluer la transmission des effets de l'environnement entre générations, il est impossible de remplacer les animaux par des analyses *in vitro*.

7294. Le but de cette étude est d'effectuer des tests fonctionnels pour le nouveau Moniteur d'Intégrité du Nerf (MIN). Des tests fonctionnels de fil-électrode et électrode sans fil seront également effectués à l'aide de la nouvelle console MIN. Les résultats de cette étude seront utilisés pour démontrer que le prototype de la console et de l'électrode MIN répondent aux exigences spécifiques proposées pour ce produit ainsi qu'aux besoins de l'utilisateur.

Nous proposons d'utiliser jusqu'à 4 animaux porcins en tout, 2 séances avec 1 animal, et pour chaque séance 1 animal supplémentaire en cas de besoin.

Cette étude d'un nouveau Moniteur d'Intégrité du Nerf (MIN) dépend de la réaction physiologique. L'interaction entre les utilisateurs et le nouvel équipement en salle opératoire ne peut pas être simulée de manière exacte. Cela nous permet de calibrer et de tester l'équipement, mais pas de certifier son exploitabilité. Cela est dû au fait que les résultats obtenus sont plus complexes en présence d'équipement de salle d'opération qui ne peuvent pas être facilement adaptables à une simulation.

Les 3R :

1. Remplacement : méthodes permettant d'éviter ou de remplacer l'utilisation d'animaux pour la recherche

En dehors de l'évaluation *in vivo*, aucune méthode permettant de stimuler les fonctions physiologiques des nerfs gauches, droits, faciaux et vagues chez l'humain ou l'animal n'est connue. L'étude du système *in vivo* d'un nerf et de son (ses) innervation(s) musculaire(s) associée(s), ainsi que la capacité à stimuler le nerf et à surveiller la réaction musculaire concomitante sont indispensables pour évaluer un dispositif de cette nature. Cette étude est tributaire des paramètres physiologiques et d'une physiologie précise.

2. Réduction : méthodes permettant aux chercheurs d'obtenir une quantité d'informations similaire en utilisant moins d'animaux, ou d'obtenir plus d'informations en utilisant le même nombre d'animaux.

Pour 2 séances, nous utilisons 1 animal afin d'effectuer des évaluations répétables de vérification, auquel s'ajoute 1 animal supplémentaire en cas de besoin pour chaque séance. Le nombre d'animaux à utiliser est déterminé en vérifiant que les fonctionnalités soient réalisables, répétables et constantes.

3. Raffinement : méthodes permettant de réduire ou minimiser une potentielle douleur, souffrance ou détresse, et permettant une amélioration du bien-être des animaux.

Il n'existe pas de procédures moins invasives ou moins stressantes permettant l'application d'EMG pour des chirurgies du visage, de l'oreille, du nez ou de la gorge. Les animaux seront sous traitement médicamenteux ou sédatifs tout au long de l'intervention chirurgicale.

7295. Ce projet concerne l'évaluation d'un produit immunologique destiné à protéger contre une maladie parasitaire mortelle chez une espèce de carnivore domestique.

La mise en œuvre de ce projet comporte quatre procédures expérimentales permettant d'évaluer l'efficacité de ce produit et d'obtenir des données complémentaires sur les mécanismes de protection mis en jeu.

Cette procédure est conçue en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité : cette procédure ne peut pas, pour le moment, être remplacée par des méthodes expérimentales alternatives

- le nombre d'animaux par groupe, déterminé dans le but d'obtenir des données valides. Au total, un nombre maximum de 527 carnivores domestiques sera impliqué dans ce projet ;

- un hébergement des animaux en groupe de manière à ne pas induire un stress d'isolement

- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal

- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;

- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

7296. La valeur nutritionnelle des matières premières pour l'alimentation des volailles a fait l'objet de nombreux travaux. Cependant, l'évolution du contexte de production - compétition entre alimentation animale et humaine, demande mondiale en protéine, réduction des gaspillages alimentaires, progrès génétique et technologique, réglementation- va modifier l'utilisation des aliments pour volailles. Il est donc nécessaire d'évaluer au fil de l'eau la valeur des aliments pour les volailles.

La méthode d'évaluation de la valeur nutritionnelle *in vivo* des aliments et des matières premières pour les volailles, publiée en 1990, et utilisant le modèle coq adulte, sert de référence en Europe et dans le monde. Cette méthode, appelée méthode des bilans individuels, a permis la construction de tables d'alimentation pour les filières animales, et reste la méthode de référence *in vivo* : les conditions d'hébergement et la procédure ont été définis en commun par les cinq structures de recherche dans le domaine en France, afin de travailler en réseau et de pouvoir échanger des données.

L'objectif de ce projet est de fournir aux opérateurs nutritionnistes volailles des références *in vivo* sur les ingrédients utilisés en France et à l'étranger. 240 coqs mâles adultes seront utilisés, soit une bande de 60 animaux renouvelée chaque année. Les animaux sont élevés en groupe jusqu'au stade adulte puis placés en cage individuelle pour les bilans.

Prise en compte des 3R :

- Remplacement. Les particularités anatomiques et digestives des oiseaux ne permettent pas de les remplacer par un autre modèle animal. Par ailleurs il n'existe à ce jour aucune méthode *in vitro* permettant de simuler la réponse de l'animal.

-Réduction : cette méthode permet de travailler avec 8 animaux par mesure, et s'agissant d'animaux adultes de réaliser plusieurs bilans successifs sur le même animal, préalablement accoutumé à la cage. Le développement d'outils d'analyse performants (type SPIR) permet de réduire le recours à l'animal, mais nécessite une calibration préalable.

-Raffinement : les animaux sont adaptés aux cages et entraînés à des manipulations et mesures, ce qui permet de réduire les stress. D'autre part les cages ont été entièrement réaménagées suite à un travail en commun avec un fournisseur pour concilier le bien-être des animaux et les contraintes de la procédure.

7297. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger (suite à une simple piqûre). Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. Il s'agit du même principe que la vaccination. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre (ou concentration) est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir :

- Remplacer : une réponse immunitaire ne peut être réalisée que sur un organisme vivant à ce jour et nous choisirons une espèce appropriée pour la production d'anticorps,
- Réduire : optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole au minimum nécessaire et suffisant,
- Raffiner : améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile.

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps) ;
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps ;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps ;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 1 ou 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 1100 protocoles, représentant 2200 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 42 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

7298. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes suite à une simple injection de ce dernier, suivi de rappels (même principe que la vaccination). Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les

anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir :

- Remplacer : une réponse immunitaire ne pouvant avoir lieu que dans un organisme vivant, nous choisissons l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps avec soin (cf ci-dessous),
- Réduire : optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole au strict nécessaire et suffisant,
- Raffiner : améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile des animaux avec utilisation de moyens antalgiques appropriés.

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps) ;
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps ;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps ;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole de 1 à 5 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 40 protocoles, représentant 200 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 83 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

7299. Notre processus de production assure le développement d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes, suite à une simple injection répétée (rappels) sur le même principe que la vaccination. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes.

Cette diversité constitue une défense efficace contre les pathogènes. Les AcP peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les AcP (antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. Ce programme se base sur une approche originale d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1992, qui consiste à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'induire une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer in situ comme immunogène et déclencher rapidement une réaction



immunitaire. Des échantillons de sang de l'animal seront prélevés pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire). Lorsque le titre est suffisamment élevé, un antisérum est préparé en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis. Si nécessaire, une purification des anticorps est effectuée à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (animal vivant indispensable pour la réponse immunitaire et choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole au nombre nécessaire et suffisant), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile par utilisation de méthodes antalgiques appropriées).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps) ;
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps ;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps ;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole à 2 individus.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 80 protocoles, représentant 160 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 42 jours ou 77 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé, l'injection se réalise en introduisant une aiguille dans le muscle du tibia conformément aux bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

7300. Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique ; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger suite à une simple injection de l'antigène (avec plusieurs rappels comme pour une vaccination). Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les anticorps polyclonaux possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum puis, si nécessaire, de la purification des anticorps à partir du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (animal vivant indispensable pour la réponse immunitaire et choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole au nombre nécessaire et suffisant), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile par utilisation de méthodes antalgiques appropriées).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps) ;
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps ;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps ;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

Le lapin est l'animal le plus communément utilisé pour la production d'AcP parce qu'il est facile à manipuler et que, pour la plupart des applications, il produit des volumes suffisants d'antisérum à titre élevé et à forte affinité. Il permet ainsi de Réduire le nombre d'animaux engagés dans chaque protocole.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 10 protocoles, représentant 350 lapins.

Le temps minimum d'immunisation est de 70 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine de 21 jours et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. En fonction du type d'adjuvant utilisé, la procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les lapins sont hébergés en cage individuelle, les portoirs sont situés en vis à vis afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (morceau de bois à ronger, biscottes ...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

7301. La thérapie génique est une stratégie innovante de médecine moléculaire consistant à transférer un acide nucléique thérapeutique dans des cellules malades pour améliorer l'état clinique d'un patient. Pour véhiculer ce produit thérapeutique, les vecteurs viraux, et en particulier les vecteurs recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAVr) constituent des outils de choix. Il a été montré qu'une seule injection avec un AAVr peut permettre une expression à long terme du gène thérapeutique transféré, aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme. Les vecteurs viraux dérivés de l'AAV sont en passe de devenir des produits thérapeutiques dont l'un d'entre eux vient d'obtenir récemment une autorisation de mise sur le marché pour le traitement d'une maladie génétique rare. Néanmoins, malgré des succès récents, un des facteurs majeurs limitant l'efficacité du transfert de gène *in vivo* à l'aide d'AAVr dans les essais cliniques provient de la réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur. Dans certains cas, celle-ci est responsable de la destruction des cellules transduites, annihilant de fait tout bénéfice de la thérapie génique. L'occurrence de cette réponse immune délétère s'explique par le fait que les hommes sont naturellement infectés au cours de leur vie par des virus AAV sauvages (virus qui ne sont par ailleurs à ce jour associés à aucune pathologie chez l'homme).

L'objectif de ce projet repose sur le potentiel de la chimie organique pour améliorer l'« activité spécifique » et l'« index thérapeutique » d'une particule AAV recombinante choisie. Ces améliorations, non explorées jusqu'à présent, vont être obtenues par l'emploi de ligands ayant des propriétés de ciblage, couplés à la capsid d'un AAV. Ces modifications chimiques accentueront le ciblage vers un organe ou un tissu spécifique, comme le foie, la rétine ou le muscle squelettique, ce qui en retour permettra une réduction de la quantité d'AAV à administrer au patient.

Au-delà de l'augmentation du tropisme cellulaire, ces capsides modifiées chimiquement pourraient également échapper en partie au moins à des facteurs naturellement neutralisants et donc diminuer l'effet de la réponse immunitaire.

Des premiers tests seront effectués sur différents types de cellules en culture pour évaluer l'effet de la modification chimique sur le vecteur. Cependant, les modèles *in vitro* ne peuvent s'approcher de la complexité des interactions entre le vecteur et l'environnement biologique *in vivo* et rendent donc difficile la reproductibilité de ces résultats *in vivo*. Il est également impossible de vérifier la biodistribution ou encore l'index thérapeutique de ces particules modifiées sur des cellules en culture. L'utilisation de la souris est donc ici justifiée pour évaluer ces deux paramètres *in vivo*. Le protocole envisagé à savoir l'administration d'AAVr modifié chimiquement ou non *in vivo*, est une procédure ayant déjà été réalisée dans des modèles murins avec une bonne tolérance générale. En comptant les groupes contrôles, nous avons estimé que nous aurons besoin d'au plus 256 souris mâles pour l'expérimentation. Une courbe de poids hebdomadaire ainsi qu'une inspection visuelle quotidienne des animaux seront réalisées. Tout signe clinique notable sera suivi par l'expérimentateur.

7302. L'alimentation constitue la voie majeure d'exposition au Bisphénol A, un contaminant alimentaire libéré à partir des emballages alimentaires. Cependant, des études récentes suggèrent que l'exposition transcutanée pourrait constituer une voie d'entrée non négligeable du BPA dans l'organisme. Ainsi, les niveaux urinaires de BPA total sont plus élevés chez les caissières qui manipulent fréquemment du papier thermique contenant du BPA, comparativement à ceux de la population générale.

Dans les études de biosurveillance chez l'homme, l'exposition interne humaine est généralement évaluée à partir de prélèvements sanguins réalisés au niveau de la veine brachiocéphalique qui draine le sang veineux de la main.

Nous faisons l'hypothèse selon laquelle l'absorption transcutanée de BPA au niveau de la main pourrait expliquer en partie des concentrations plasmatiques élevées chez l'homme dans le réseau vasculaire drainant la zone exposée, i.e. la veine brachiocéphalique, avant sa redistribution et sa dilution dans la circulation générale systémique.

Le premier volet de notre étude a pour objectif d'évaluer si le drainage local d'une zone cutanée exposée au bisphénol A peut conduire à des niveaux élevés de concentrations plasmatiques de BPA dans la veine drainant la zone exposée, en comparant la cinétique temporelle des concentrations plasmatiques de BPA dans la veine céphalique ipsilatérale et controlatérale après application d'une solution de BPA au niveau du membre antérieur.

L'exposition humaine au BPA par voie cutanée est essentiellement liée à la manipulation des tickets de caisse. Pour reproduire ces conditions d'exposition humaine, l'objectif de la deuxième étude expérimentale est d'évaluer le transfert du BPA dans l'organisme

à partir de tickets de caisse thermosensibles contenant du bisphénol A appliqués sur la peau de l'abdomen pendant 24 heures. Pour cela, les concentrations de BPA et du BPA-G seront mesurées à la fois dans le sang, les urines et les fèces sur une période de 96h. Notre étude ne peut se passer d'un modèle intégré (*in vivo*), réunissant l'ensemble des systèmes physiologiques et des voies métaboliques mis en jeu dans la bio disposition des molécules. Elle ne peut se dérouler chez l'homme, c'est pourquoi le recours à l'animal vivant et en bonne santé est indispensable.

Nous travaillons chez le chien, espèce de référence pour en pharmacocinétique à visée humaine. Le nombre de chiens utilisés dans l'étude (5) est à la fois le plus réduit possible mais suffisant pour assurer la robustesse des analyses des résultats obtenus. Les animaux sont hébergés dans des locaux d'animalerie conformes aux plus hauts standards (température, hygrométrie, ventilation...) de la réglementation concernant l'espèce canine ; les chiens disposent de l'espace nécessaire à leur développement, de dispositifs de jeu et sont familiers du personnel d'animalerie et des expérimentateurs qu'ils côtoient au quotidien, ce qui leur assure les meilleures conditions de vie et de bien-être pour préserver un état de santé optimal.

7303. L'objectif général de notre projet est de fournir des informations de base 1) sur l'excrétion urinaire et les effets toxiques de plusieurs substances chimiques (solvant, plastifiants) après des expositions orales répétées 2) sur leur passage transplacentaire. Le projet est original car cette évaluation n'a pas, à ce jour, été rapportée dans la littérature scientifique.

Ces travaux devraient apporter des informations nouvelles sur les dangers associés à ces substances lors d'expositions prolongées. Les évaluateurs et les gestionnaires de risques environnementaux et professionnels pourront s'appuyer sur ces connaissances lors de leurs prises de décision (ex : établissement de doses de référence pour la surveillance biologique par des organismes réglementaires). Le nombre estimé d'animaux utilisés pour le projet est de 192 rats mâles Sprague-Dawley, 192 rates non gestantes Sprague-Dawley (hors élevage), 168 rates non gestantes Sprague-Dawley (élevage) pour obtenir 128 femelles gestantes en expérimentation et leurs portées, soit 1920 fœtus (avec 15 fœtus/portée). Soit un total de 2472 animaux.

La première procédure mise en œuvre est l'administration par gavage : Une solution de la substance testée sera administrée quotidiennement à l'animal vigile pendant 2 ou 4 semaines, à raison de 5 ou 10 ml/kg, à l'aide d'une sonde de gavage appropriée pour l'espèce. L'autre procédure est le recueil de l'urine de l'animal en utilisant une cage métabolique individuelle, de dimensions adaptées à la taille de l'animal. La durée de séjour dans la cage sera généralement de 24 heures et se limitera à 4 jours au maximum. Les animaux seront préalablement habitués aux conditions de l'expérience et auront un temps de récupération après leur séjour dans la cage.

Moyens mis en œuvre pour respecter la règle des 3R :

La détermination précise de l'élimination d'une substance et de ses métabolites ne peut être déterminée qu'en recueillant les urines des animaux. De même, la quantification de l'exposition du fœtus par transfert placentaire nécessite d'obtenir une réponse intégrée de l'organisme maternel et fœtal. Il n'existe donc pas de méthode alternative pouvant Remplacer l'utilisation d'animaux pour ce projet.

Nous appliquerons des modèles expérimentaux validés qui suivent les recommandations générales des lignes directrices de l'OCDE et de l'EPA pour les essais de produits chimiques, notamment en ce qui concerne l'espèce, le nombre de doses testées, le nombre d'animaux par dose, et la durée du traitement.

Dans le but de Réduire le nombre d'animaux utilisés, les informations sur l'excrétion urinaire et la toxicité de la substance chimique seront obtenues à partir du même animal, ce qui conduira à obtenir davantage d'informations avec le même nombre d'animaux.

Raffiner consistera à préférer une durée d'exposition subaiguë (28 jours) à une exposition sub-chronique (90 jours), à habituer les animaux aux cages à métabolisme de manière à limiter leur stress, à surveiller régulièrement l'état général des animaux par des observations cliniques, des pesées et l'analyse de paramètres biochimiques urinaires, à établir un point limite précis. Il sera basé sur le changement de poids, et/ou une modification prolongée de l'aspect ou du comportement de l'animal. L'atteinte du point limite conduira à l'arrêt de l'administration de la substance et à l'euthanasie compassionnelle de l'animal si son état général est très dégradé.

7304. Le médulloblastome représente la première cause de tumeur cérébrale maligne chez l'enfant de moins de 15 ans et demeurent la première cause de mortalité par cancer chez l'enfant. Cette tumeur se développe dans la fosse postérieure du cerveau au niveau du cervelet et du quatrième ventricule. Même si son incidence reste rare, le médulloblastome est une tumeur invasive, avec un fort potentiel métastatique. La probabilité de survie sans récurrence à 5 ans est estimée à 64%. Bien que le taux de survie ait fortement progressé depuis une vingtaine d'années notamment grâce aux traitements par radiothérapie et chimiothérapie, ces traitements demeurent agressifs et induisent des séquelles importantes à long terme de type endocriniennes (retard de croissance) et cognitives (retard de développement, troubles de l'apprentissage...). Très récemment, la compréhension de la biologie de ces tumeurs notamment grâce aux analyses moléculaires ont permis d'établir une sous-classification en 4 sous-groupes moléculaires notamment en fonction des voies de signalisation impliquées qui sont corrélés à un pronostic vital très différent. Il est donc important de trouver de nouvelles approches thérapeutiques plus sélectives et moins agressives pour améliorer la survie et la qualité de vie de ces jeunes patients.

Pour mener à bien nos travaux, nous avons besoin de disposer de modèles expérimentaux pertinents, proches de la physiopathologie humaine, qui reposent sur l'utilisation de cellules humaines xénotransplantées chez la souris *Nude* au niveau du site tumoral (xénotransplantes orthotopiques). A l'heure actuelle, ces modèles ne peuvent pas être remplacés par des approches alternatives *in vitro* en raison de l'absence du microenvironnement tumoral et de la barrière hémato-encéphalique (remplacement).

Dans ce projet, nous avons pour objectif de mettre en place au niveau du laboratoire un modèle de médulloblastome qui sera établi à partir de 3 lignées cellulaires de médulloblastomes (DAOY, D283 Med, D341 Med). Ces lignées sont utilisées classiquement pour nos évaluations *in vitro* et sont représentatives des sous-groupes les plus agressifs pour les lignées D283 et D341 et seront comparées

à la lignée la plus étudiée DAOY. Pour nos modèles de médulloblastome, nous avons choisi d'injecter une suspension cellulaire (100 000 cellules contenu dans 2 µL de milieu de culture) par stéréotaxie au niveau du cervelet (hémisphère droit) chez des souris *Nude* âgées de 5-6 semaines (8 souris par lignée seront nécessaires soit un total de 24 souris). Les tumeurs seront prélevées à 10 ou 20 jours post-injection pour une analyse morphologique (analyses anatomopathologiques). Ces prélèvements permettront d'obtenir des informations sur la croissance et l'éventuelle dissémination tumorale dans le tissu sain. Dès les premiers signes de troubles moteurs ou neurologiques, les souris seront euthanasiées par une surdose d'anesthésique (raffinement) et le cervelet sera également prélevé pour une analyse morphologique. Il est à noter que le laboratoire possède déjà une bonne expertise dans l'obtention de modèle de tumeurs cérébrales adultes xénogreffées en orthotopique chez le rongeur. Pour le moment et à notre connaissance, peu d'études ont été réalisées sur ce genre de modèle, par conséquent les résultats obtenus nous permettront de caractériser le développement tumoral de nos modèles et de définir le temps optimal de traitement pour de futures études. De même, ces résultats permettront d'éliminer le modèle qui ne répondrait pas aux critères nécessaires à la réalisation de nos études précliniques notamment si le développement tumoral est trop lent ou trop rapide (réduction).

7305. L'autisme est une maladie du développement diagnostiquée en présence de deux symptômes : (1) une perturbation du comportement social et (2) des comportements répétitifs.

On ne connaît actuellement pas la cause de la maladie et il n'existe pas de traitement satisfaisant pour soulager les malades et leurs familles. Le projet que nous développons a pour objectif 1) de mieux comprendre l'origine de la maladie et 2) de proposer de nouveaux traitements.

Nous travaillons chez la souris, qui est un animal social : nous utilisons notamment des souris qui présentent des mutations génétiques ressemblant à celles des patients autistes. Nous testons chez ces animaux différents traitements afin de vérifier s'ils pourraient être proposés comme nouveaux médicaments pour soigner l'autisme.

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant le principe des 3R à savoir raffiner, réduire et remplacer.

Nous raffinerons nos expériences en prenant un soin particulier à supprimer et soulager l'inconfort, ou l'angoisse potentiel subi par les animaux tout au long du protocole expérimental. Par exemple, nous hébergeons nos animaux dans un environnement enrichi (maisonnette en carton, matériel de nidification) afin d'augmenter le bien-être des animaux. De plus nous avons défini des points limites pour l'ensemble de nos expériences pour ne pas exposer les animaux à des situations d'inconfort.

Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser nos expériences nous nous attachons d'une part à utiliser les animaux des deux genres (males et femelle). D'autre part, nous testons chaque animal dans plusieurs paradigmes comportementaux afin d'obtenir le plus d'information possible pour nos cohortes expérimentales. Enfin, l'utilisation d'outils statistiques puissants nous permet de réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation des expériences.

Nous ne pouvons toutefois pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisé qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

La mise en œuvre du projet de recherche nécessitera l'utilisation de 2140 souris.

7306. Contexte. La technologie des ultrasons focalisés, connue par l'acronyme HIFU, permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière totalement non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant sa coagulation puis sa nécrose. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. Les HIFU sont déjà utilisés en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Nous envisageons de traiter de cette façon les varices. Cette technologie permet de remplacer les techniques chirurgicales ou les méthodes endo-veineuses (laser, radiofréquence...) par un geste totalement non invasif. Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité. Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention chirurgicale et d'hospitalisation réduites, par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, durée d'hospitalisation faible, douleurs moindres...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages du dispositif se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (la durée d'hospitalisation, notamment). Objectif général. Notre but est d'évaluer l'efficacité de notre dispositif de traitement HIFU pour l'occlusion de petites veines dans le contexte du traitement des varices. A ce stade de maturité du projet, l'utilisation d'animaux ne peut être évitée car le processus de fibrose conduisant à l'occlusion est un phénomène biologique long et complexe ne pouvant être modélisé numériquement ou lors d'expériences *ex vivo*. Le nombre d'animaux a été réduit au maximum pour évaluer la faisabilité du traitement. Si aucune occlusion n'est constatée après la moitié de l'essai, celui-ci sera annulé et les animaux restant ne seront pas traités. Le traitement HIFU est appliqué aux patients humains non anesthésiés et est réputé indolore. Dans notre cas, les animaux sont anesthésiés car une immobilité parfaite doit être obtenue. Nous prévoyons l'utilisation de 4 à 5 lapins par lot expérimental ce qui est le minimum nécessaire pour comparer valablement l'effet sur les tissus de nos différents schémas de traitement.

Modèle animal et méthode : Des traitements HIFU seront délivrés sur les veines auriculaires ou saphènes de lapins. Ce modèle est pertinent pour atteindre l'objectif de ce projet. Sa localisation la rend accessible avec le dispositif de traitement HIFU. Les lapins seront anesthésiés et on appliquera l'énergie HIFU par voie externe. Après traitement, les lapins seront réveillés pour que le processus de fibrose conduisant à l'occlusion veineuse, dont la durée est de l'ordre d'une à deux semaines, puisse avoir lieu. Après leur réveil, ils seront placés sous analgésique en cas de douleur. Les animaux seront ensuite euthanasiés après une durée n'excédant pas quatre

semaines après le traitement. Une vérification de l'occlusion de la veine sera réalisée par Doppler avant euthanasie. Les veines traitées seront prélevées post mortem. Une analyse histologique des sections de veines prélevées sera réalisée afin de vérifier l'occlusion et l'avancée du processus de fibrose. Cinquante lapins seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

7307. La rétinite pigmentaire et la dégénérescence maculaire liée à l'âge sont deux maladies rétinienne résultant de la perte des photorécepteurs dans la rétine et pour lesquelles les traitements actuels ne concernent qu'une très faible proportion de malades. Bien que de nouvelles thérapies visent à prévenir la dégénérescence des photorécepteurs, il apparaît important de développer une approche thérapeutique dans le but de restaurer une vision utile. Les prothèses rétinienne ou « rétines artificielles » proposent de remplacer les photorécepteurs par un système de stimulation électrique des neurones rétinienne résiduels.

Une étape essentielle en vue de valider une telle approche chez l'Homme est de confirmer l'efficacité de telles prothèses chez un modèle de primate non humain (PNH). Le PNH, tout comme l'Homme, présente une macula (zone de la rétine où la vision est la plus détaillée), absente chez les rongeurs.

Ce projet permettra de valider une nouvelle génération d'implants plus performants en travaillant sur la géométrie optimale de l'implant (géométrie des pixels, nombre de photodiodes par pixel). De plus, les aspects de biocompatibilité des matériaux (analyse de la réaction inflammatoire du tissu rétinienne au contact de l'implant) pourront être évalués directement chez le PNH, ce qui n'a été fait jusqu'ici que chez le rongeur.

Sur les 5 ans de l'étude, le nombre estimé d'animaux sera de 30 adultes. Trois géométries d'implants seront testées sur 3 groupes de 10 animaux. Sur chaque groupe de 10, 5 seront implantés au niveau de la macula tandis que les 5 autres seront implantés en périphérie. La présente demande d'autorisation décrit les différentes chirurgies d'implantations de rétines artificielles ainsi que des électrodes d'enregistrements, fenêtres crâniennes et fixations. Les implants seront placés sous la rétine des primates après décollement de cette même rétine. L'utilisation de l'imagerie rétinienne *in vivo* permettra de suivre l'évolution du recollement rétinienne et de la position de l'implant.

L'utilisation d'une procédure d'électrophysiologie (électrodes fixées sur le crâne) permettra l'enregistrement d'éventuelles activations du cortex visuel après stimulations rétinienne de l'implant. Des enregistrements corrélés aux stimulations prouveraient un transfert effectif d'information de la rétine jusqu'au cortex. Cette étude électrophysiologique est utilisée afin de pouvoir répéter les mesures sur le même animal, ce qui réduit de façon importante le nombre d'animaux à utiliser pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Des tests d'imagerie corticale et d'électroencéphalographie pourront aussi être réalisés afin de compléter l'étude électrophysiologique.

Des études comportementales telles que le tracking de la position des yeux suite à des stimuli seront réalisées. Les réflexes optocinétiques, de poursuite visuelle et de saccades pourront alors être quantifiés afin de vérifier la fonctionnalité des implants.

Toutes les interventions chirurgicales se feront sous anesthésie générale pour réduire la contrainte imposée aux animaux. Ce projet s'appuie sur des études préalables *in vivo* chez des modèles rongeurs. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie *in vivo* et l'analyse électrophysiologique permettent de diminuer le nombre d'animaux. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a signe de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

7308. Utilisation d'outils diagnostics pour étudier l'infection par le virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) chez la truite arc en ciel

Le virus de la Nécrose Hématopoïétique Infectieuse (vNHI) est responsable d'une maladie réglementée au niveau Européen qui induit de fortes mortalités dans les élevages de salmonidés (truites arc-en-ciel et saumons principalement). Il est également retrouvé dans le milieu sauvage.

Initialement identifié sur le continent américain, ce virus est apparu en Europe dans les années 1980s. Une diversité génétique importante a été décrite, avec l'existence de cinq groupes génétiques présentant une répartition géographique clairement identifiée au niveau mondial.

Des méthodes directes et indirectes peuvent être utilisées en diagnostic, dans le premier cas pour détecter le virus, et dans le second pour détecter des anticorps produits en réponse à une infection virale. Elles permettent de déterminer le statut sanitaire d'un élevage. Une étude menée en 2015 afin de valider une technique moléculaire de détection du vNHI ciblant une partie du génome viral et une méthode de détection des anticorps dirigés contre ce virus a permis de mettre en évidence des différences intéressantes des réponses immunitaires des poissons infectés, et ce malgré des profils de virulence comparables.

Les objectifs de ce nouveau projet sont d'apporter des éléments de compréhension des mécanismes infectieux et immunitaires mis en place par la truite arc en ciel en fonction du groupe génétique et de la virulence des souches de vNHI.

Une épreuve infectieuse expérimentale sera réalisée sur des truites arc-en-ciel juvéniles produites au sein de la structure expérimentale. Elle permettra de déterminer les profils de virulence de 6 isolats viraux en suivant la mortalité induite après contamination des animaux par balnéation. Des prélèvements (organes et sang) seront réalisés à différents temps post-infection pour évaluer la quantité de virus présente et la réponse immunitaire des individus. Des prélèvements sanguins seront également effectués sur les poissons qui auront survécu pour confirmer les résultats obtenus lors de l'essai précédent.

Le critère de mortalité utilisé pour déterminer le niveau de virulence et répondre aux objectifs fixés ne permet pas de remplacer les animaux mais les procédures expérimentales ont été élaborées afin de réduire au maximum leur nombre et de raffiner leur utilisation. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (volume

d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel, ...). L'infection par baignade sera également privilégiée par rapport à l'injection. Le nombre d'alevins nécessaire pour l'évaluation de la virulence des souches sera au maximum de 4200. La réalisation des infections expérimentales, à raison de 2 répétitions pour une souche testée, répond aux exigences statistiques et intègre les contraintes de densité et la variabilité inter-bacs fréquemment observée.

7309. La présence de substances polluantes (HAPs, pesticides, microplastiques) dans les eaux de surface mondiales ainsi que leurs effets néfastes sur la faune et la flore aquatiques sont bien documentés. Le dosage de biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet est fréquemment utilisé pour estimer l'écotoxicité de ces molécules chez le poisson. L'utilisation d'épreuves infectieuses expérimentales est une approche complémentaire originale permettant d'apporter des éléments sur les perturbations potentielles induites au niveau immunitaire chez le poisson contaminé. Dans ce projet, l'essai expérimental sera réalisé chez le médaka japonais (*Oryzias latipes*). Il associera une épreuve infectieuse au virus de l'encéphalopathie et de la rétinopathie (VER ou nodavirus) et des contaminations chimiques semblables à celles observées dans l'environnement. L'impact d'une pollution simple au benzo(a)pyrène, une molécule modèle en écotoxicologie, mais également celui d'un mélange de HAPs et de microplastiques seront évalués. Pour ce faire, une procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel, ...). En ce qui concerne le remplacement, l'utilisation du médaka japonais est nécessaire puisque c'est une espèce-modèle en écotoxicologie et qu'aucune méthode alternative n'a pas encore été développée pour réaliser ces travaux ; amphidrome de très petite taille, avec un cycle de vie court, le médaka est élevé et utilisé couramment dans les laboratoires. Au total, 720 alevins (animaux immatures âgés de +7 jours à 2 mois) serviront à l'évaluation des écotoxicités recherchées. Ils seront exposés à l'une des trois conditions polluantes pendant 48h puis seront éprouvés à la souche de nodavirus w80. La souche w80 est une souche utilisée comme référence pour les études en virologie piscicole ; isolée chez le bar, elle est également pathogène pour le médaka. Le comportement natatoire des poissons ainsi que la mortalité seront suivis quotidiennement pendant les 6 semaines suivant l'infection virale.

7310. L'emphysème est un trouble pulmonaire irréversible de l'adulte, lié au tabagisme, conduisant à une insuffisance respiratoire, par destruction des alvéoles. Près de 10% des personnes de plus de 65 ans en sont atteints. La dysplasie broncho pulmonaire est une maladie touchant le nouveau-né prématuré, conduisant à un élargissement des alvéoles dont l'aspect est très proche de l'emphysème, et qui constitue un facteur de risque ultérieur de développement d'emphysème. Ces maladies présentent des similitudes à savoir une intense agression extérieure (tabac/oxygénothérapie) et un rôle clé des fibroblastes.

Le fibroblaste est une cellule de soutien des structures alvéolaires, il sert au développement de ces structures au début de la vie, et ultérieurement, à les réparer lors d'agressions. Or, dans l'emphysème, leurs capacités de réparation sont diminuées et dans la dysplasie, ils n'arrivent pas à se différencier pour assurer un développement pulmonaire normal, sans que les mécanismes en cause soient connus.

Ce mauvais fonctionnement pourrait être lié à une sénescence accrue, qui correspond à un arrêt de la croissance des cellules. Il s'agit d'un mécanisme majeur du vieillissement, mais elle peut survenir de manière accélérée après une agression. Les cellules sénescentes ne peuvent plus se diviser, donc se différencier ou réparer. Elles restent aussi très actives et sécrètent des substances nocives pour leur environnement. Il a d'ailleurs été montré une accumulation de fibroblastes sénescents dans les poumons emphysémateux, mais sans que leur rôle n'ait pu être démontré.

Comprendre les causes de la dysfonction des fibroblastes face à des agressions extérieures (tabac dans l'emphysème et oxygène dans la dysplasie) est indispensable pour promouvoir de nouveaux traitements dans ces maladies.

Dans ce travail, nous voulons connaître le rôle de la sénescence et de la protéine p16, un effecteur majeur de la sénescence, dans les fibroblastes au cours de ces deux maladies. Nous déterminerons si des souris n'ayant pas la protéine p16, sont protégées, et si l'élimination des cellules exprimant p16 peut améliorer les lésions pulmonaires quand elles sont constituées. Nous étudierons ensuite les fonctions des fibroblastes de ces souris, pour déterminer l'implication de ces cellules dans les phénomènes observés et les mécanismes mis en jeu. Nous limiterons au maximum le nombre de souris utilisées (864 souris en 3 ans), en respectant le bien-être des animaux. Le modèle animal ne pouvant pas être remplacé actuellement pour ces deux pathologies.

7311. La coqueluche, maladie infectieuse respiratoire induite par la bactérie *Bordetella pertussis*, est encore aujourd'hui une cause de mortalité infantile et reste un réel problème de santé publique même dans les pays à forte couverture vaccinale. Nous travaillons depuis de nombreuses années sur cette maladie. L'OMS a estimé en 2008 le nombre de cas de coqueluche à 16 millions à travers le Monde, dont 95% ont eu lieu dans les pays développés. Toujours cette même année, 195 000 enfants âgés de moins d'un an sont morts de cette maladie.

Les programmes de vaccination actuels, malgré une couverture vaccinale estimée à 87% (OMS, 2016) offrent une protection du nourrisson qui n'est pas complète avant le 6ème mois. Or il est connu aujourd'hui que l'entourage proche représente la source majeure de contamination de l'enfant par le phénomène appelé cocooning. De plus, la communauté scientifique commence à pointer du doigt le manque d'efficacité des vaccins acellulaires présents sur le marché car d'une part, ces vaccins ont une durée de protection assez faible, d'où la nécessité de revacciner régulièrement et d'autre part, ces vaccins protégeraient contre les effets de la maladie mais pas contre la transmission de la bactérie.

Nous avons donc développé dans le laboratoire un nouveau type de vaccin contre la coqueluche. Il s'agit d'un vaccin vivant administrable par voie intra-nasale (évitement de pique), basé sur l'atténuation génétique de certains facteurs de virulence responsables des symptômes de la maladie que sont la Toxine Pertussique, la Toxine DermoNecrotique et la Toxine CytoTrachéale (PT, DNT et TCT respectivement).

Ce vaccin offre l'avantage, du fait de son administration dans le nez, de mimer l'infection (sans les effets toxiques) et de permettre ainsi de protéger l'hôte au niveau local et systémique et d'induire une protection contre l'agent infectieux plus longue.

Dans un but de développement et de mise sur le marché d'un vaccin, de nombreuses études précliniques sont demandées avant même le passage en essais cliniques chez l'Humain. De ce fait, il nous est indispensable de vérifier la potentialité de ce vaccin et de ses dérivés (mutations supplémentaires introduites dans un but d'amélioration du vaccin) par des expériences de colonisation et de protection contre la souche sauvage. Nous devons également étudier les réponses immunitaires induites par notre vaccin, et donc utiliser des modèles animaux de souris KO ou déficientes, telles que les TLR2, TLR4, TLR5, Triff, MyD88 KO et SCID mise en plus des souris Balb/C et C57 Black6 sauvages.

Il nous tient à cœur d'appliquer au mieux la règle des 3R. C'est pour cela que nous réduisons au maximum le nombre de souris par groupe nécessaire pour respecter les minimas statistiques. De plus, comme il nous est impossible de remplacer ce modèle animal, base de notre étude de potentialité vaccinale, nous serons extrêmement vigilant sur le respect de la notion de points limites, notamment en ce qui concerne la souffrance animale éventuelle (Prostration, perte de poids, difficulté respiratoire etc....)

Au vue des 3 procédures expérimentales, des différentes souches et espèces de souris, ainsi que des différents mutants du vaccin et souches cliniques de *Bordetella pertussis* à étudier, nous aurons besoin de 1290 souris par an, soit 6450 souris sur 5 ans pour atteindre les objectifs de notre projet.