



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

Résumés non techniques des projets autorisés (46)

4601. La vaccination est une des plus grandes avancées humaines en termes de santé publique. Cependant, les vaccins de demain doivent répondre aux exigences de sécurité et d'efficacité exprimées tant par les sociétés pharmaceutiques que civiles, et doivent être adaptés à la pathologie ou à la population ciblées (nouveau-nés, personnes âgées, etc.). Les adjuvants sont indispensables pour renforcer la réponse immunitaire à un vaccin mais sont aujourd'hui controversés. En effet, l'innocuité des adjuvants à base de sels d'aluminium qui sont les plus largement utilisés est aujourd'hui discutée, c'est pourquoi le développement de nouveaux adjuvants est essentiel.

Notre laboratoire développe actuellement une formulation vaccinale originale utilisant un polymère biodégradable et biocompatible, qui est capable de contenir des molécules immunostimulantes, ceci afin de stimuler et orienter la réponse immunitaire. Un gros avantage de cette formulation est qu'elle peut être entièrement dégradée par l'organisme après son action. Son efficacité pour l'obtention d'anticorps de haute affinité ainsi que son innocuité ont déjà été démontrées chez l'animal. Notre objectif est de développer de nouvelles applications de cette formulation adaptée à la prévention des pathologies notamment virales.

Dans le cadre du développement de ces formulations, nous avons pour but aujourd'hui d'évaluer leurs possibilités à potentialiser le pouvoir adjuvant de la formulation en analysant les différentes réponses immunitaires engagées au niveau de l'organisme.

L'étude de l'efficacité de ces adjuvants nécessite 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 l'analyse de la production des anticorps, notamment au niveau muqueux, ainsi que de leur affinité. De plus, nous souhaitons identifier les réponses immunitaires engagées de manière générale, tant au niveau cellulaire qu'humoral, pour une réponse systémique ou muqueuse. C'est pourquoi le modèle murin, qui est un modèle bien caractérisé est nécessaire.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer, de manière prospective, des nouvelles formulations d'adjuvants biodégradables qui seront capable de potentialiser les réponses immunitaires induites lors d'une infection type.

Le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 723 animaux sur une période de 5 ans

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 géré grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "*ad libitum*" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

4602. L'hypoxie, ou baisse de la disponibilité en oxygène, est souvent présente dans le microenvironnement tumoral et elle est associée à un mauvais pronostic clinique et une agressivité tumorale accrue. L'hypoxie tumorale est due à une vascularisation insuffisante du tissu tumoral, du fait que les cellules tumorales prolifèrent très rapidement par rapport à la capacité à générer de nouveaux vaisseaux sanguins au sein du microenvironnement tumoral. L'hypoxie est bien décrite dans la littérature scientifique comme induisant une résistance aux traitements conventionnels du cancer (radiothérapie, chimiothérapie). Notre équipe a montré récemment que l'hypoxie tumorale est également responsable d'une résistance des cellules tumorales à la mort induite par les cellules tueuses du système immunitaire (lymphocytes T, Cellules Natural killer). Il est de plus en plus décrit que la tumeur crée un écosystème qui altère les fonctions de reconnaissance et de protection du système immunitaire, ce qui favorise la progression tumorale. Aider le système immunitaire à retrouver une meilleure efficacité contre la tumeur en bloquant les effets néfastes de l'écosystème tumoral représente une stratégie thérapeutique pertinente. Malgré les succès récents de l'immunothérapie avec l'utilisation des anticorps monoclonaux, son efficacité reste encore limitée. L'objectif de ce projet est donc de cibler les facteurs inhibiteurs présents dans le microenvironnement tumoral, comme l'hypoxie, dans le but d'intégrer ce ciblage dans des stratégies d'immunothérapie.

Les molécules clés de la signalisation de l'hypoxie dans les cellules sont des facteurs de transcription (HIF-1 et HIF-2). Quand l'apport en oxygène diminue, ces facteurs sont stabilisés à l'intérieur des cellules tumorales et ils peuvent alors activer l'expression de nombreux gènes impliqués dans la croissance et l'agressivité tumorales.

Nous testerons l'effet de la molécule ITPP (myo-inositol trispyrophosphate) sur l'hypoxie tumorale. L'ITPP a pour fonctions d'augmenter le relargage de l'oxygène transporté par l'hémoglobine des globules rouges, et donc améliore l'oxygénation tissulaire.

De ce fait, l'ITPP peut contrebalancer l'hypoxie régnant dans le microenvironnement tumoral. Notre programme vise ainsi à analyser les effets de l'ITPP sur les marqueurs de l'hypoxie et sur la croissance tumorale.

L'utilisation d'animaux vivants (souris) est indispensable dans ce projet, car elle permet de voir l'impact de l'ITPP dans un microenvironnement tumoral complexe. De plus le microenvironnement tumoral qui se développe dans la souris est proche de celui de l'Homme, ce qui nous permet d'avoir une meilleure approche de l'efficacité de la molécule ITPP in vivo. Ce type d'expérience ne peut se faire in vitro car la mécanique est trop complexe pour reconstruire un microenvironnement adéquat pour le développement des tumeurs et l'augmentation de l'oxygénation tissulaire qui, pour l'ITPP, passe par la présence d'hémoglobine.

Pour cela, nous prévoyons donc d'utiliser le modèle murin pour lequel nous disposons de lignées tumorales capables, une fois implantées dans l'organisme de la souris, de reproduire la complexité du microenvironnement tumoral humain. Nous utiliserons le modèle tumoral murin LL2 (tumeur pulmonaire). Nous étudierons la croissance tumorale, et les marqueurs de l'hypoxie par immunohistochimie à partir du même lot de souris (facteur de réduction).

Pour la durée de ce projet, nous estimons à un total de 90 le nombre de souris pour réaliser une expérience. Les expérimentations in-vivo seront réalisées toutes les 6 semaines pour nous permettre d'analyser les résultats avant de démarrer de nouvelles expériences et de modifier, voire annuler le protocole suivant les résultats précédents obtenu in-vivo et in-vitro afin de réduire le nombre d'expériences, ceci est un facteur potentiel de réduction.

Lors des expériences, les souris seront étroitement suivies et les observations cliniques montrant la souffrance seront particulièrement surveillées. Toutes les injections et administrations seront faites sur animaux anesthésiés par isoflurane. Les animaux bénéficieront en tout temps d'un environnement enrichi par des cocoons. Des points limites précis et précoces seront strictement appliqués.

4603. Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

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

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

Dans cette situation, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc électrique de très faible intensité lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Ce projet, incluant un maximum de 192 rats, a pour objectif d'identifier le mécanisme d'action du produit E2, dérivant du produit E1 testé précédemment dans notre laboratoire et présentant des propriétés anxiolytiques. Nous souhaitons savoir si l'effet anxiolytique du produit E2 est comparable à celui du produit E1 et s'il est comparable à celui du diazépam ou de la Buspirone, composés pharmacologiques de référence agissant sur des récepteurs différents.

L'administration de Flumazénil, bloquant l'action du Diazépam, anxiolytique de référence, ou de NAN-190, bloquant l'action de la Buspirone, autre anxiolytique de référence, par voie intrapéritonéale (IP), permettra d'identifier la voie pharmacologique du produit E2 administré par voie orale dans le test d'enfouissement défensif conditionné (EDC) chez le Rat mâle Wistar adulte.

Le projet sera découpé en 2 parties : une première étude sur 84 à 96 animaux répartis en 6 groupes de traitement (Véhicule, Diazépam et Produit E2 avec et sans traitement avec le Flumazénil) permettra de démontrer si le produit E2 a une activité comparable à celle du Diazépam. Une deuxième étude sur également 84 à 96 animaux répartis en 6 groupes de traitement (Véhicule, Buspirone et Produit E2 avec et sans traitement avec le NAN-190) pour démontrer si le produit E2 a une activité comparable à celle de la Buspirone.

Pour l'ensemble des expériences, les animaux seront habitués au dispositif expérimental pendant les 3 jours précédents le test. Le test de l'EDC sera effectué 80 minutes après le traitement par voie intrapéritonéale et 60 minutes après le traitement par voie orale (Procédure 1). Le comportement des animaux sera enregistré pendant 5 minutes pour étudier différents paramètres suite à la délivrance du choc électrique de faible intensité mais inévitable (Procédure 2), suite à quoi le rat sera sorti du dispositif expérimental et mis à mort si aucune réutilisation des animaux n'est possible ou envisagée. Les animaux seront observés régulièrement tout au long de l'expérimentation et ceux présentant un comportement anormal (agressivité, cachexie, vocalises...) seront exclus de l'étude et mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais effectués permettront de déterminer la voie pharmacologique d'action du produit E2 nécessaire pour réduire l'anxiété des animaux dans le test de l'EDC. Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire (réduction) permettant une exploitation statistique des résultats (raffinement).

4604. Le diabète est une maladie fréquente qui affecte plus de 3 millions de personnes en France. Les différentes formes de diabète se caractérisent par des taux élevés de glucose dans le sang. Dans le cas du diabète de type 1, cette hyperglycémie est causée par un défaut de production d'une hormone du pancréas, l'insuline. Une activation anormale du système immunitaire est responsable de la destruction des cellules pancréatiques productrices d'insuline, et de ce fait, le diabète de type 1 est considéré comme une maladie auto-immune. C'est une maladie mortelle si les patients ne peuvent compenser la perte de leur propre production d'insuline par des injections quotidiennes d'insuline synthétique.

Les facteurs responsables de l'activation anormale du système immunitaire dans le diabète de type 1 ne sont pas connus avec précision. Ils sont probablement une combinaison de facteurs génétiques, infectieux et environnementaux.

Au début des années 90, une nouvelle catégorie de pathogènes a été associée à des maladies auto-immunes : ce sont les rétrovirus endogènes. Ils se sont intégrés dans le génome humain au cours des millions d'années d'évolution, et ils représentent actuellement environ 8% de notre génome. La protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène humain (HERV) de la famille W, nommée HERV-W-Env, est impliquée dans le développement de la Sclérose en plaques (SEP) qui est aussi une maladie auto-immune. Il existe un médicament permettant de neutraliser le HERV-W-Env, et il est actuellement testé en essais cliniques chez l'homme pour le traitement de la SEP.

Des études préliminaires ont mis en évidence la présence de la protéine HERV-W-Env dans le sérum de patients atteints de diabète de type 1 (43% des cas à ce jour) et dans les lésions pancréatiques de patients diabétiques de type 1 (75% des cas à ce jour). HERV-W-Env pourrait donc être impliqué dans la survenue de certains cas de diabète.

Pour tester cette hypothèse, nous avons besoin de développer un modèle animal pour savoir si la protéine d'enveloppe du rétrovirus endogène HERV-W peuvent entraîner le développement d'une auto-immunité et d'un diabète de type 1. L'objectif est ensuite de soigner les souris rendues diabétiques avec les médicaments permettant de neutraliser HERV-W-Env. Si nous parvenons à confirmer notre hypothèse, des molécules très prometteuses pour le traitement du diabète de type 1 pourraient ultérieurement testées chez l'homme.

Avant de commencer des expérimentations sur un modèle murin, nous avons préalablement développé des tests cellulaires confirmant l'implication de HERV-W-Env dans des dysfonctions des cellules pancréatiques. HERV-W-Env entraîne également l'activation des cellules immunitaires humaines. Cela nous a permis de nous placer dans l'optique du « remplacement » des 3R : des modèles cellulaires ont initialement remplacé des modèles murins. Le médicament permettant de neutraliser HERV-W-Env a également été testé sur les cellules pancréatiques et immunitaires et s'est révélé être très efficace.

Afin de « réduire » au maximum le nombre d'animaux utilisés, nous allons effectuer nos expériences de manière successive et non en parallèle. Cela nous permettra, d'ajuster les protocoles en fonction des premiers résultats. Nous envisageons pour ce projet l'utilisation de 250 souris sur 5 ans.

Les procédures seront également « raffinées » au maximum, et tout au long du projet, des personnes qualifiées seront en charge des soins apportés aux animaux et veillerons à leur bien-être. Les dommages attendus sur les animaux sont l'apparition d'un diabète. Il est généralement admis qu'une glycémie à jeun supérieure à 250mg/dL signe l'apparition d'un diabète. Les animaux atteignant cette limite seront euthanasiés. De plus, toutes les procédures d'injections et de mesure de glycémie seront réalisées de manière à diminuer au maximum la souffrance de l'animal.

4605. Après la mise bas, les infections de l'utérus par des germes banals comme *Escherichia coli* et *Trueperella pyogenes* sont présentes chez 10 à 40% des vaches laitières, et provoquent une inflammation légère de la paroi utérine, appelée endométrite. Cette inflammation évolue de façon chronique pendant plusieurs semaines et interfère avec l'établissement d'une nouvelle gestation. Le traitement conduit le plus souvent à l'administration d'antibiotiques par voie locale. Le rôle de la génétique dans la variabilité de la sensibilité individuelle à ces infections, ainsi que le lien avec la sensibilité à d'autres infections ne sont pas connus.

Dans ce contexte, les objectifs de ce projet sont de déterminer les mécanismes de réponse de l'utérus à une infection polymicrobienne, et de vérifier si la sélection génétique sur la résistance aux mammites crée des différences de réponse de l'endomètre à ces infections.

En l'absence de méthode *in vitro* permettant de reproduire les mécanismes physiologiques complexes que nous souhaitons étudier, nous utiliserons un modèle ovin. En effet, l'espèce ovine (i) est la seule espèce de ruminant dans laquelle un modèle de résistance génétique aux mammites préalablement caractérisé est disponible, (ii) a des caractéristiques physiologiques et immunitaires suffisamment proches de celles des bovins pour que les données ainsi acquises soient transposables à cette espèce, (iii) possède une faible fréquence d'infections utérines spontanées, ce qui permet de disposer facilement de femelles dont l'utérus est sain préalablement à une infection expérimentale.

Trois lots expérimentaux de 5 animaux, effectif minimal pour permettre une comparaison statistique inter-groupes des résultats, seront utilisés. Les deux premiers groupes seront constitués de brebis appartenant respectivement à des lignées sensible et résistante aux infections mammaires, qui ont été créées et caractérisées par l'INRA, et chez lesquelles nous provoquerons une endométrite à l'aide de souches bactériennes isolées de l'utérus d'une vache. Le dernier groupe (groupe témoin) sera constitué de brebis résistantes aux infections mammaires qui ne seront pas infectées expérimentalement.

Toutes les brebis proviendront d'un élevage agréé et seront livrées une semaine avant inoculation pour leur laisser le temps de s'adapter à leur nouvel environnement et ainsi diminuer leur stress. Elles seront logées sur aire paillée et nourries à volonté avec du foin. Durant la semaine précédant l'inoculation, elles seront observées de manière biquotidienne lors de la distribution de la ration (foin) et feront l'objet d'une prise de température rectale chaque matin, afin de détecter une éventuelle infection intercurrente.

L'inoculation intra-utérine sera effectuée sous anesthésie générale, par laparoscopie. L'intervention sera réalisée par un chirurgien expérimenté de manière à réduire au maximum la durée d'anesthésie (15 minutes environ).

Après 24 heures d'évolution, les brebis seront euthanasiées par injection létale et les lésions de la paroi utérine, ainsi que la charge bactérienne seront déterminées. Des prélèvements de tissu endométrial seront réalisés afin de caractériser la modification du profil d'expression des gènes.

4606. Le but de ce projet est l'évaluation de l'effet thérapeutique des acteurs du cycle de recyclage du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) sur la progression de la cardiomyopathie dans le cadre de la dystrophie musculaire liée à des mutations dans deux gènes codant des protéines de l'enveloppe nucléaire.

L'espèce animale utilisée pour ce projet est la souris *Mus musculus*. En effet, Afin d'étudier la physiopathologie de cette pathologie 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 ; atteintes des muscles squelettique et cardiaque. Les premiers symptômes sont détectés dès 3 mois chez les mâles homozygotes et évoluent rapidement jusqu'au décès des animaux provoqué principalement par l'aggravation du phénotype cardiaque. Par conséquent ce modèle constitue le modèle de référence pour tester l'administration de nicotinamide riboside à fin de déterminer ces effets thérapeutiques sur la progression du phénotype cardiaque et musculaire dans le contexte de cette pathologie.

Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est 80. 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.

La méthode d'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction cardiaque est non invasive et nécessite uniquement une anesthésie légère. L'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction sur le muscle squelettique est non invasive mais nécessite néanmoins un protocole qui engendre chez l'animal une demande d'effort physique sous la contrainte de l'expérimentateur.

Le milieu est enrichi avec du « woodwools » ou du coton compacté en formats prédécoupés de dimensions 50 x 50 mm pour la nidification des souris. Des igloos (maisonnettes) en polypropylène sont disposés dans les cages permettant les jeux et le repos des souris.

4607. Les myopathies myofibrillaires sont des maladies musculaires qui apparaissent spontanément ou se transmettent de façon génétique, et qui détruisent progressivement les muscles des personnes atteintes. En particulier, plus d'une soixantaine de mutations actuellement recensées dans le gène de la desmine, qui forme un filament spécifique du muscle, sont responsables de ce type de maladie, appelée dans ce cas, desminopathie. Ces muscles sont principalement ceux des membres et le cœur, ainsi que le diaphragme qui actionne les poumons. Afin d'étudier le déroulement histologique et les caractéristiques moléculaires de la maladie, mais aussi pour tester des traitements pharmacologiques potentiels visant au minimum à soulager les patients, nous avons choisi d'obtenir une lignée de souris dans laquelle une copie du gène desmine est remplacée par un mutant qui ne remplit plus sa fonction normale. Cette mutation est choisie comme donnant lieu à un cas sévère de myopathie chez les patients. Ceci nous permettra d'étudier un modèle de la maladie alors que jusqu'à présent il ne nous était possible de travailler que sur des cellules en culture, un modèle moins proche de la maladie et des patients. 546 animaux sont prévus pour cette étude sur cinq ans, et qui n'induit que peu de dommages puisque le traitement le plus invasif consiste en des injections intrapéritonéales de produits pharmacologiques à visée thérapeutique anti-agrégatifs. Nous avons appliqué la règle de limitation (des "3 R") en réduisant au maximum à 4 animaux par point expérimental, par sexe et par âge, et en utilisant les tests statistiques appropriés (réduction). Nous utiliserons les points d'arrêt pour stopper les procédures en cas de souffrance, ou l'euthanasie si la situation n'est pas réversible (raffinement). Enfin, nous avons procédé à des études cellulaires pour sélectionner les produits les plus efficaces pour le traitement pharmacologique, ce qui réduit considérablement le nombre d'animaux à utiliser (remplacement).

4608. 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 de l'AMPC qui joue un rôle clé dans la régulation de la fonction cardiaque. Mais son activation chronique entraîne des perturbations électrophysiologiques (troubles du rythme cardiaque) et participe à la progression vers l'IC. Les niveaux d'AMPC sont finement régulés par des enzymes qui le dégradent, les phosphodiésterases (PDEs) (dont la famille des PDE4 (PDE4B et PDE4D), critique pour réguler l'activité cardiaque). L'objectif général du projet est de comprendre la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et plus particulièrement la régulation de l'activité automatique du cœur (=pacemaker).

L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer cette hypothèse. Des souris normales et génétiquement invalidées pour la PDE4D seront utilisées afin d'évaluer le rôle de cette enzyme dans la régulation de la fonction pacemaker. 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 aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés. 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 pacemaker adultes et par le fait que les cellules pacemaker natives ne conservent pas un phénotype stable et ne

survivent pas au-delà de quelques heures de mise en culture primaire. Il se justifie également par l'impossibilité de simuler ex vivo la mise en place de la pathologie cardiaque qui est un processus complexe.

Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction,

Raffinement, Remplacement). Une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux qui seront 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 les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Le nombre total de souris utilisées dans le projet sera de 230.

4609. 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 de l'AMPc qui joue un rôle clé dans la régulation de la fonction cardiaque. Mais son activation chronique entraîne des perturbations électrophysiologiques (troubles du rythme cardiaque) et participe à la progression vers l'IC. Les niveaux d'AMPc sont finement régulés par des enzymes qui le dégradent, les phosphodiesterases (PDEs) (dont la famille des PDE4 (PDE4B et PDE4D), critique pour réguler l'activité cardiaque). L'objectif général du projet est de comprendre la physiopathologie de l'insuffisance cardiaque et plus particulièrement la régulation de l'activité automatique du cœur (=pacemaker).

L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer cette hypothèse. Des souris normales et génétiquement invalidées pour la PDE4B seront utilisées afin d'évaluer le rôle de cette enzyme dans la régulation de la fonction pacemaker.

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 aussi de réduire le nombre d'animaux utilisés.

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 pacemaker adultes et par le fait que les cellules pacemaker natives ne conservent pas un phénotype stable et ne survivent pas au-delà de quelques heures de mise en culture primaire. Il se justifie également par l'impossibilité de simuler ex vivo la mise en place de la pathologie cardiaque qui est un processus complexe.

Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux qui seront 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 les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Le nombre total de souris utilisées dans le projet sera de 230.

4610. L'arthrose est une maladie des articulations synoviales qui, lorsqu'elle devient symptomatique, est responsable de douleur très invalidante tant chez l'homme que chez l'animal. Pourtant, il n'existe à ce jour aucune thérapie efficace, le traitement est uniquement symptomatique avec une prise en charge de la douleur. Par conséquent, il est primordial de développer des recherches innovantes dans ce domaine.

Dans la présente demande, nous allons étudier l'efficacité des nouveaux traitements contre l'arthrose chez les rongeurs (souris et rats). Les modèles de gonarthrose (arthrose du genou) chez le rat montrent une asymétrie d'appui, ressemblant à la tendance des patients à éviter l'appui sur un genou arthrosique.

Le présent projet consiste à évaluer l'efficacité ainsi que la tolérance envers le traitement contre l'arthrose chez les rongeurs. Il complète un projet antérieur possédant déjà une validation in vitro. Des études in vivo sont indispensables pour caractériser les propriétés des médicaments testés dans les tissus vivants. Nous allons utiliser un modèle expérimental qui développe de l'arthrose chez les rongeurs. Afin d'obtenir des résultats statistiquement valables tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, nous allons utiliser 65 rats ou souris par essai incluant 5 groupes expérimentaux pour constituer un modèle d'étude, en raison de 2 essais au maximum par an pour les rats et 4 essais pour les souris, donnant un nombre total d'animaux de 650 rats et 1300 souris sur 5 ans. Parmi les 5 groupes expérimentaux, il y aura un groupe contrôle qui ne reçoit par le traitement et les groupes traités avec différentes doses. L'objectif est de déterminer l'effet thérapeutique des molécules testées des groupes traités versus le groupe contrôle. Les traitements seront appliqués par deux principales voies (intra-articulaire et orale). Des examens cliniques des animaux (comportements, état de genoux, signes cliniques, etc.), Des prise de sang et des analyses histologiques seront effectuées. Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal. Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Nous appliquons le même protocole et les mêmes règles d'éthiques sur tous les modèles animaux.

4611. Durant 6 séances de Travaux Pratiques de Physiologie et de Pharmacologie (3 en 1ère année et 3 en 2ème année), les étudiants réaliseront des prélèvements d'organes (duodénum et utérus de rat, iléon, oreillettes et taenia coli de Cobaye), sur animal anesthésié. La technique d'organe isolé (couramment utilisée en Recherche et Développement de l'industrie pharmaceutique et la production animale, domaines principaux d'emploi de nos étudiants) permet de mettre en évidence les effets de substances d'origine naturelle ou synthétique à l'échelle de l'organe, ceux-ci n'étant pas visualisables par des méthodes alternatives telles que les méthodes actuelles de biologie cellulaire et moléculaire ou ExAO. Cela permet en outre d'appréhender la variabilité interindividuelle.

Ces organes prélevés en *ante mortem* sont ensuite maintenus dans un dispositif de survie approprié (nutriments, température, oxygénation adaptés) afin d'étudier leur fonction dans différentes conditions expérimentales (étude de la relation dose/effet, notion d'antagonisme...)

Ce travail s'effectuera sur des rats ou des cobayes préalablement analgésiés et anesthésiés (Raffiner) qui seront euthanasiés immédiatement après le prélèvement selon la réglementation en vigueur. Afin de minimiser au maximum le nombre d'animaux utilisés, certains organes seront fragmentés ou bien plusieurs organes différents sont prélevés sur le même animal (Réduire).

En conséquence sur une année scolaire, 18 rats, 16 rattes et 42 cobayes seront nécessaires pour ces 3 séances de TP en 1ère année pour l'encadrement de 130 étudiants et 3 séances de TP en 2ème année pour l'encadrement de 60 étudiants (Réduire).

Sur 5 ans: 380 animaux utilisés pour la formation de 650 étudiants.

4612. Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de méthodes de diagnostic et de contrôle des infections causées par *Mycoplasma bovis*, un pathogène majeur responsable de pneumonies, de mammites, d'arthrites et d'otites chez les bovins. Malgré l'impact considérable de cette maladie à l'échelle mondiale, les méthodes de diagnostic et de contrôle sont largement insuffisantes et souvent inefficaces. Les approches classiques sont en effet confrontées à la grande capacité de variation et d'adaptation de cette bactérie. Des données récentes sur le génome de ces organismes permettent de proposer une approche vaccinale innovante ciblant des protéines peu variables et communes à toutes les bactéries analysées. Ce projet a pour objectif d'évaluer les défenses immunitaires que développe le bovin contre ces composants peu variables du pathogène. Afin de réduire le nombre d'animaux (limité à un lot de 5 animaux), les immunisations seront réalisées à l'aide de bactéries inactivées et la réponse de l'hôte contre chaque composant bactérien sera évaluée *ex-vivo* au laboratoire. La méthode d'immunisation utilisée respectera les procédures établies pour cette espèce animale. L'immunisation sera réalisée à l'aide d'une formulation couramment utilisée dans le secteur vétérinaire. Cette formulation permet d'éviter les effets secondaires parfois observés avec d'autres adjuvants. Les immunisations (limitées à 2 injections) et les prélèvements sanguins (hebdomadaires) seront réalisés par du personnel qualifié. Les animaux seront hébergés dans le respect des normes spécifiées par le décret 2013-118 du 1er février 2013. L'eau et les aliments seront fournis sans restriction. La manipulation des animaux sera réalisée par du personnel qualifié et un suivi clinique sera réalisé par le vétérinaire responsable de l'étude.

4613. Ce projet est un projet de recherche fondamentale dans le domaine de la santé publique. Les maladies cardiovasculaires sont encore un problème de santé publique et les perspectives ne sont pas encourageantes du fait de l'augmentation de la prévalence des maladies métaboliques, notamment du diabète. Un nombre important de décès par mort subite chaque année montre notre incapacité à prévoir ces accidents et notre méconnaissance des facteurs de risque. Notre projet est de montrer chez la souris que le processus infectieux est une source de déstabilisation des plaques d'athérosclérose et donc d'infarctus du myocarde. Dans notre hypothèse, le rôle des polynucléaires neutrophiles (PMNs) a un rôle clé. Pour cette démonstration, le projet s'articule autour de trois étapes. La 1ère montre que les PMNs peuvent entrer dans les plaques et les fragiliser. Dans la deuxième étape, nous soumettons les souris à 3 modèles d'infection qui correspondent à trois types d'infection : aigüe (injection de LPS), sub-aigüe (péritonite induite par perforation du caecum) et chronique (gingivopathie). Pour chacun de ces modèles, nous examinerons l'effet de l'infection sur la stabilité de la plaque d'athérosclérose. La dernière étape a pour but d'établir la comparabilité de nos données acquises chez les souris aux paramètres humains en étudiant des fragments d'athérectomie humaine stockés dans une bio banque. Nous utilisons des souris dans les deux premières étapes, car notre étude impose l'analyse de plaques d'athérosclérose qui ne peuvent être obtenues que chez l'animal vivant. Nous utiliserons 365 souris, nombre qui a été déterminé de façon à obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). 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 d'éviter toute souffrance inutile. L'avantage attendu de ce projet est la définition du rôle des PMNs dans l'infarctus du myocarde et ainsi l'acquisition d'un outil permettant d'éviter l'infarctus.

4614. Les leucémies sont des affections malignes se développant dans la moelle des os et dans le sang. Il existe des leucémies aiguës, d'évolution rapide et nécessitant un traitement lourd, et des leucémies chroniques, d'évolution plus lente, pour lesquelles il n'existe pas toujours de traitement. La leucémie myélomonocytaire chronique est caractérisée par l'accumulation dans la moelle osseuse, le sang et souvent la rate de globules blancs appelés monocytes parfois accompagnés d'une anémie et d'une thrombopénie ou d'une thrombocytose. Cette maladie touche le sujet âgé puisque l'âge moyen lors du diagnostic est d'environ 72 ans avec une nette prépondérance masculine (2/1). Cette maladie est peu fréquente mais grave puisque la survie des patients est

inférieure à 2 ans. C'est une pathologie clonale de la cellule souche hématopoïétique. Le diagnostic s'appuie sur une augmentation du chiffre des monocytes sanguins au-delà d'une valeur seuil bien définie et ce pendant au moins 3 mois. L'âge avancé des patients ne permet pas d'utiliser la greffe de moelle et il n'existe actuellement aucun traitement curateur. Le phénotype de la maladie est la conséquence d'altérations épigénétiques potentiellement réversibles sous agents déméthylants, faisant de ces derniers le traitement privilégié lorsque la maladie est sévère. L'effet bénéfique, observé chez 40% des patients, reste cependant limité dans le temps, et l'impact sur la survie n'est pas validé. De nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires dans cette maladie.

L'existence de modèles cellulaires pourrait en faciliter l'étude mais il n'existe pas actuellement de lignée cellulaire représentative de la forme chronique de la maladie. Pour tester des thérapeutiques alternatives aux médicaments existants, d'autres modèles sont nécessaires. De plus, il n'est pas possible de modéliser l'autorenouvellement des cellules souches (hématopoïétiques), base de la chimiorésistance et de la dominance clonale des cancers. La xénogreffe de cellules souches leucémiques humaines chez la souris immunodéprimée est indispensable pour tester et sélectionner des molécules d'intérêt. C'est pourquoi nous envisageons de tester quatre alternatives dans deux lignées de souris immunodéficientes humanisées pour trouver le meilleur modèle : l'injection intraveineuse et intra-fémorale de cellules souches (CD34+) seules de patients, l'injection intra-fémorale de la moelle totale contenant aussi les cellules souches mésenchymateuses, l'injection intra-fémorale de cellules souche (CD34+) avec des cellules mésenchymateuses stromales, et la création de microenvironnements médullaires en sous-cutané avant d'injecter les cellules leucémiques. L'ensemble de ces tests sur cellules de patients et de donneurs sains nécessitera 540 animaux pour évaluer si ces modèles permettent de générer des greffes secondaires et tertiaires.

La validation du modèle repose sur la mise en évidence de monocytes et granulocytes humains dans le sang des souris greffées. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, nous suivrons l'évolution des paramètres hématologiques (en particulier la leucocytose) tous les mois. A la fin des procédures (mort des animaux), nous regarderons la taille de la rate et de tous les organes, étudierons l'évolution des paramètres hématologiques dans le sang, la moelle et la rate et regarderons l'impact de la greffe sur les anomalies moléculaires clonales et la progression tumorale vers une leucémie chez 20 patients (180 animaux nécessaires). Une fois le meilleur modèle établi, nous testerons 5 inhibiteurs avec leurs véhicules respectifs chez 20 patients (1600 animaux nécessaires) pour voir si nous pouvons éradiquer la maladie. Au total, un nombre maximal estimé maximal de 3760 souris pour la totalité du projet pourra être requis (sachant que les suivis longitudinaux des animaux au cours du temps pourront certainement permettre de réduire ce nombre maximal estimé).

Les souris étant des animaux sociaux, elles seront élevées en groupe sociaux de 3 à 6 par cage et leur environnement sera enrichi pour limiter l'ennui et le stress.

Les injections et les prélèvements étant des procédés douloureux, tous seront réalisés sur animaux anesthésiés. Nous administrerons également des analgésiques pendant 2 à 3 jours après les interventions pour limiter/supprimer la douleur occasionnée. Pour toutes les procédures, les animaux seront visités tous les jours. Si un animal présente des signes de souffrance ou de stress, nous appliquerons strictement les points limites choisis. La perte de poids et la déshydratation seront notamment des paramètres essentiels que nous prendrons soin d'observer et d'éviter. Une alimentation adaptée leur sera mise à disposition dans le cas où nous remarquerions une diminution de la prise alimentaire et de l'hydratation.

4615. Depuis ces dernières décennies, on assiste à une augmentation des cas de fibrose pulmonaire. Environ 1.2 millions d'individus seraient affectés. La fibrose pulmonaire (FP) est une maladie chronique caractérisée par des processus de cicatrisation exagérés suivis de la formation de cicatrices (fibrose) dans les poumons qui se rigidifient et ne parviennent plus à assurer correctement la respiration. La FP se manifeste par un essoufflement progressif et une toux sèche. Il n'existe pas actuellement de traitement efficace contre la FP. Le traitement peut au mieux freiner l'aggravation de la maladie. Les traitements prescrits agissent sur la survenue des symptômes ou servent à limiter la progression de la fibrose (un médicament anti-fibrosant, la pirféridone permet de ralentir l'aggravation de la maladie) et de l'inflammation pour permettre un meilleur contrôle de la maladie. Les anti-inflammatoires disponibles actuellement ont des activités limitées et présentent de nombreux effets indésirables. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point des traitements efficaces de la fibrose pulmonaire

Notre objectif est d'évaluer l'activité anti-fibrosante et anti-inflammatoire de produits pharmacologiques en cours de développement, candidats-médicaments, dans un modèle de fibrose pulmonaire chez la souris. Le développement de candidats-médicaments à partir de modèles moléculaires et cellulaires disponibles requiert une transposition dans des modèles intégrés et complexes. C'est pour cette raison qu'une approche in vivo chez la souris est nécessaire pour s'assurer de l'activité anti-inflammatoire des nouveaux candidats-médicaments.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale est la plus utilisée 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 s'assurer de l'activité anti-fibrosante et anti-inflammatoire des nouveaux candidats-médicaments.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 8, 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.

#### Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet de mesurer l'activité d'un candidat-médicament à l'aide de 48 souris réparties en 4 groupes: un groupe témoin, un groupe contrôle recevant le candidat-médicament, un groupe témoin de la fibrose pulmonaire, et un groupe thérapeutique avec administration du candidat-médicament dans la fibrose pulmonaire.

Il est prévu d'évaluer l'activité de 4 candidats-médicaments par an (192 souris) sur une période de 5 ans, soit un total de 960 souris.

4616. L'échinococcose est une zoonose (infection ou maladie pouvant se transmettre directement ou indirectement entre les animaux et les humains) parasitaire due à un ténia qui peut infecter l'homme. Deux formes principales sont décrites en France, l'échinococcose alvéolaire (EA) et l'échinococcose kystique (EK) ou hydatidose, causées par des espèces de ténia différentes.

L'échinococcose alvéolaire touche principalement le foie chez les personnes infectées, après une incubation de 4 à 15 ans. Trente nouveaux cas humains d'EA sont diagnostiqués tous les ans en France. Ce diagnostic, en général tardif, est suivi de l'instauration d'un traitement à vie ou d'une greffe de foie. Le parasite *Echinococcus multilocularis*, comme tous les ténias, boucle son cycle de développement chez 2 hôtes avec un rongeur (en général le campagnol terrestre) comme hôte intermédiaire et un carnivore (en général le renard) comme hôte définitif. L'homme se contamine à partir de l'hôte définitif. Une étude récente a montré que l'aire de répartition d'*E. multilocularis* n'était pas limitée au nord-est de la France comme on le pensait jusqu'alors mais s'étendait jusqu'à l'ouest, incluant la région parisienne.

L'hydatidose est due au parasite *Echinococcus granulosus* dont 5 espèces sont identifiées actuellement. Plus de 600 cas humains sont diagnostiqués tous les ans en France, le plus souvent l'origine géographique de la contamination n'est pas établie. Le cycle de développement du parasite s'effectue aussi chez deux hôtes, le chien qui héberge la forme adulte et un herbivore (mouton, bovin, porc) pour la forme larvaire. Chez l'homme la maladie est très invalidante et entraîne un traitement médical à vie avec souvent un traitement chirurgical dû à la compression occasionnée par les vésicules parasitaires dans les poumons ou le cerveau. Des moutons et bovins infectés par la forme larvaire ont été identifiés en abattoir sur tout le territoire national, ainsi que des porcs en Corse. La technique de référence pour la recherche des parasites chez l'hôte définitif est longue (examen du contenu du tube digestif et du grattage de la paroi intestinale). Même si des adaptations techniques développées chez le renard permettent de réduire ce temps de recherche en conservant la même sensibilité, d'autres techniques plus rapides sont développées. Elles s'appuient sur la biologie moléculaire et la mise en évidence de coproantigènes (antigènes présents dans les fèces) ; leurs développements demandent un matériel biologique de haute qualité. Ces mêmes techniques de biologie moléculaire sont utilisées pour identifier les formes larvaires infectant l'hôte intermédiaire ou l'homme.

Ce projet vise à produire des ténias chez les trois hôtes définitifs principaux en Europe (renard, chien et chien viverrin) qui sont impliqués dans les deux formes d'échinococcose. Les parasites produits suite aux infections expérimentales serviront :

- à l'étude du développement du parasite chez les principaux hôtes définitifs,
- au développement de tests fiables de diagnostic par biologie moléculaire et détection d'antigènes,
- à la validation chez le chien viverrin (hôte définitif potentiel) d'une technique similaire à la technique rapide de diagnostic utilisée chez le renard et pour contrôler la répartition spatiale du parasite dans l'intestin des hôtes
- à l'étude de la résistance des parasites aux anthelminthiques.

Le projet utilisera au maximum 37 renards, 10 chiens et 10 chiens viverrins. Dans la mesure du possible ce projet utilisera des animaux qui auraient dû être mis à mort à la fin d'autres protocoles non sévères. Il n'existe actuellement pas de méthode alternative de production de ténias adultes *in vitro*, le recours à l'animal est donc nécessaire. Quelle que soit la procédure, le déroulement de l'expérience est le même. Les larves des ténias nécessaires à l'infection expérimentale sont soit récupérées chez des hôtes intermédiaires naturels, soit produites par inoculation de souris (projet déjà approuvé en 2011). L'animal qui va être infecté est anesthésié et le broyat de larves est administré par sondage gastrique. Afin de minimiser le risque pour le manipulateur, les animaux seront euthanasiés avant la phase mature du parasite. Pour *E. multilocularis*, le temps d'apparition de cette phase mature est de 30 jours, l'animal de l'expérience sera euthanasié 25 jours après l'administration des parasites. Pour les 5 espèces d'*E. granulosus*, ce temps est de 35 à 40 jours, les animaux expérimentés seront alors euthanasiés 30 jours après leur infection. Le ténia échinocoque n'est pas pathogène pour l'hôte définitif, aucun point limite n'est donc défini dans le cadre de ce projet.

4617. L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie dont la prévalence en Europe et aux Etats-Unis est en augmentation constante, et qui est parmi les causes les plus fréquentes de morbidité et de mortalité dans le monde occidental. Elle correspond à 2% des dépenses de santé dans les pays développés. L'IC est définie comme l'incapacité du cœur à fournir un débit sanguin suffisant pour répondre aux besoins de l'organisme. Malgré le développement d'un arsenal thérapeutique moderne et efficace, le taux de mortalité annuel est encore d'environ 10%. La plupart des cas d'IC est causée par des atteintes du muscle cardiaque consécutives à une contrainte (hypertension, infarctus, insuffisance aortique, toxicité médicamenteuse, etc.) qui, lorsqu'elle est prolongée ou excessive, induit un dysfonctionnement cardiaque sur le long terme. L'insuffisance ventriculaire gauche est la cause la plus commune d'IC, celle du cœur droit est observée dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et est secondaire à un remodelage de petits vaisseaux pulmonaires. L'IC peut également être un effet secondaire aux traitements anticancéreux. Ainsi



l'identification de nouvelles cibles et la conception de traitements innovants sont d'une importance cruciale pour améliorer la qualité de vie des patients et diminuer le coût de la prise en charge.

Suite à un criblage, une nouvelle classe thérapeutique prometteuse a été développée afin d'inhiber le remodelage cardiaque, et donc permettrait de diminuer les risques à long terme liés à celui-ci. Afin d'optimiser les expérimentations animales et d'atteindre les caractéristique d'un candidat médicament des études de caractérisation ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) sont nécessaires.

Ces études in vivo sont indispensables car il n'est pas possible de les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles informatiques, seul un organisme complet permet l'étude simultanée des différents paramètres ADME. Durant leur transport dans l'organisme depuis le site d'administration, les médicaments sont potentiellement modifiés par plusieurs organes et systèmes : ces processus multiples ne peuvent pas être reproduits dans un tube à essai. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour ce type d'étude.

Nous utiliserons pour cette étude de caractérisation ADME un total de 3 000 souris sur 5 ans.

Nous prévoyons d'utiliser 40 souris par molécule testée, ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour mettre en évidence des effets qui seront statistiquement interprétables. C'est un nombre qui est classiquement utilisé pour les études ADME.

Des anesthésiques seront utilisés pour réaliser les prélèvements de sang sur les animaux.

4618. L'ischémie reperfusion myocardique est une condition physiopathologique rencontrée notamment dans l'infarctus du myocarde et correspond à une succession de 2 phases: une première phase durant laquelle le myocarde est privé d'oxygène et de nutriments, ce qui impacte initialement sa fonction puis sa survie (ischémie) puis une seconde phase supposée salvatrice durant laquelle l'apport de nutriments et d'oxygène est rétabli en même temps que l'évacuation des déchets cellulaires (reperfusion).

La cardioprotection contre l'ischémie reperfusion correspond à l'ensemble des techniques destinées à protéger les cardiomyocytes de la mort cellulaire pour diminuer les tailles d'infarctus et améliorer le pronostic des patients. Or, si les moyens de réduire les lésions d'ischémie sont essentiellement constitués par l'impératif d'une reperfusion la plus rapide possible, il est désormais admis que cette reperfusion elle-même est délétère, générant des lésions qui sont mal ciblées par les thérapeutiques actuelles. Diverses techniques visant à moduler ces lésions de reperfusion sont actuellement en cours d'évaluation sans que les essais cliniques qui en ont découlé aient permis de valider leur utilisation en pratique clinique quotidienne.

La régulation de la vie et de la mort du cardiomyocyte en ischémie-reperfusion est un phénomène complexe qui fait également intervenir des acteurs extérieurs que sont les fibroblastes cardiaques et les cellules de l'immunité innée, la réponse inflammatoire consécutive à l'ischémie étant à l'origine d'une partie des phénomènes qui vont conduire à la mort cellulaire à la phase de reperfusion. Toutes ces composantes cellulaires ont des récepteurs membranaires communs aux bases purines (ATP, ADP, UTP, UDP) dont nous avons montré que l'activation avait des effets sur la survie cellulaire (cardiomyocyte), sur la capacité de prolifération cellulaire (fibroblaste) et sur la maturation des cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques).

Nos travaux in vitro suggèrent qu'une modulation de ces récepteurs dans le contexte de l'ischémie-reperfusion myocardique pourrait permettre : (i) de diminuer la mort cellulaire des cardiomyocytes, diminuant ainsi la taille d'infarctus et le déficit de fonction contractile, bien corrélés à la survenue d'événements ultérieurs ; (ii) de diminuer la prolifération des cardiofibroblastes, limitant ainsi le degré de fibrose secondaire à un phénomène d'ischémie myocardique ; (iii) de faire adopter aux cellules dendritiques un phénotype plus anti-inflammatoire dans le but de réduire l'impact de la réponse inflammatoire locale et de préserver le myocarde encore viable au moment de la reperfusion. Parmi les différents récepteurs purinergiques existant, le récepteur P2Y11 serait le candidat alliant tous ces effets. L'utilisation d'un modèle in vivo d'infarctus du myocarde reperfusé chez la souris mâle (pour éviter l'effet protecteur de l'imprégnation ostestrogénique) est désormais indispensable à l'avancée de ce travail de recherche pour confirmer les données obtenues in vitro et les compléter par des données fonctionnelles. Nous estimons le nombre de souris nécessaires pour mener ce projet à terme à 244.

Les procédures expérimentales envisagées ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Ce projet respecte naturellement la règle des 3R

\_ Réduire: le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs. A cet effet, pour accélérer la courbe d'apprentissage liée à la mise en place du modèle, l'opérateur principal a bénéficié d'une formation auprès d'équipes maîtrisant déjà ce modèle.

\_ Raffiner: les conditions d'élevage, d'hébergement (groupes de 5), de soins (visite quotidienne avec contact tactile et verbal, environnement sonore musical) et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les souris. L'analgésie reste au centre des préoccupations des opérateurs.

\_ Remplacer: nous avons atteint les limites des explorations possibles sur nos modèles in vitro. Le modèle murin paraît être le modèle le plus approprié à ce stade.

4619. Les vaisseaux sanguins permettent l'oxygénation et la nutrition des organes. La formation des vaisseaux sanguins (c'est à dire l'angiogenèse) joue un rôle clé au cours de la croissance mais devient quiescente à l'âge adulte sauf au cours du cycle ovarien, de la grossesse et dans certaines conditions pathologiques tels que le cancer ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Des défauts d'angiogenèse sont également responsables de pathologies vasculaires comme la maladie de Rendu-Osler. Mieux

comprendre la formation des vaisseaux sanguins est donc essentiel dans un nombre important de pathologies. Cette étude vise à approfondir la compréhension du rôle de facteurs de croissance, BMP9 et BMP10 dans la formation des vaisseaux sanguins.

L'objectif de ce travail est de comprendre quelle est l'origine (cardiaque ou hépatique) du BMP10 présent dans le sang et leurs rôles dans l'angiogenèse au niveau de la vascularisation de la rétine. Pour cela, un modèle de rongeur transgénique, modèle physiologique de formation des vaisseaux sanguins, a été développé pour analyser le développement de la vascularisation de la rétine chez les nouveau-nés qui se produit entre J0 et J7 après la naissance. Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut remplacer un organisme vivant pour fournir ces informations. Le recours à des investigations in vivo est donc nécessaire.

Le modèle rongeur a été choisi pour réaliser cette étude. Les animaux sont nés et ont été élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (128) a été déterminé sur la base des données de la littérature et pour répondre aux exigences d'un test statistique (test de Mann Whitney) qui sera appliqué pour chaque expérience. Tous les animaux, permettront de répondre à la question posée, mais aussi de confirmer des résultats d'une expérimentation précédente. Ainsi, nous veillons à n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux pour assurer la validité des résultats.

Les animaux sont hébergés en groupe et en milieu enrichi de modules permettant d'améliorer leurs conditions de vie. 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.

4620. Nous avons développé une hémoglobine extracellulaire de haut poids moléculaire pour le traitement des maladies ischémiques (diminution de l'apport sanguin artériel à un organe). Cette hémoglobine fonctionne de manière complètement autonome en fixant l'oxygène de l'air et en le relarguant aux organes qui en ont besoin, sans cofacteur. Cette molécule relargue son oxygène dans un environnement hypoxique et présente une activité anti-oxydante intrinsèque.

Des modifications dans le procédé de production du produit ont été apportées pour améliorer sa formulation. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'innocuité de ces nouvelles formulations visant à éliminer les endotoxines, et de choisir ainsi à terme le procédé de fabrication pour la poursuite du développement du produit et la mise en place de la pharmaco-toxicologie réglementaire en vue de l'essai clinique de phase I. Les endotoxines sont des toxines d'origine bactérienne potentiellement dangereuses pour le receveur d'un médicament. Il est indispensable de s'assurer de leur absence avec des tests fiables et efficaces. Néanmoins une caractéristique de notre produit peut interférer avec le résultat de ce test. Par conséquent, il est indispensable de valider les résultats de ce test in vivo sur des animaux vivants. Seules les formulations dont le procédé d'élimination des endotoxines s'est révélé apparemment efficace seront testées et validées chez l'animal.

Pour réaliser ce test exploratoire d'innocuité, nous explorerons au maximum 10 procédés de production que nous comparerons à la molécule standard et à notre procédé de lyophilisation. Afin de respecter la règle des 3R, l'efficacité d'élimination des endotoxines est évaluée par un test in vitro.

Dans le but de réduire le nombre d'animaux, nous injecterons la dose la plus faible en premier et si au bout de 7 jours aucun signe de toxicité n'a été détecté, les mêmes animaux recevront la deuxième dose permettant ainsi de réaliser l'escalade de doses.

Pour limiter la contrainte et la souffrance des animaux, nous faciliterons l'accès à la nourriture avec un complément alimentaire (« Diet gel » par exemple) pour assurer la récupération de poids en cas de signe de toxicité. Nous fixerons des points limites adaptés à l'étude, et ils seront strictement appliqués. Les animaux bénéficieront d'un anesthésique local pour toutes les interventions (injections), et d'un anti-inflammatoire en cas de problème d'inflammation. Néanmoins, a priori, aucune toxicité n'est attendue. Quarante-huit animaux seront nécessaires pour ce projet (souris).

4621. L'équipe tente d'étudier, de comprendre, d'améliorer et de mettre en œuvre par des études précliniques, dans des modèles animaux, de nouvelles stratégies vaccinales contre les infections virales ou bactériennes, et s'efforce de transférer ses connaissances vers des études cliniques chez l'homme. Notre projet comporte deux volets reliés entre eux: la compréhension des réponses immunitaires aux vaccins et le développement de nouvelles stratégies de vaccination. En effet, le développement de nouvelles stratégies vaccinales dépend de l'état de nos connaissances des mécanismes de la réponse immunitaire contre les infections et les vaccins.

La thématique de recherche est principalement centrée sur l'étude du rôle des réponses cellulaires T et B, cruciales dans la lutte contre certaines infections virales ou bactériennes. Notre centre d'intérêt se porte également sur l'étude des étapes initiales de la réponse immunitaire, qui conditionnent l'efficacité de celle-ci.

Cependant des contraintes éthiques et financières rendent difficile l'étude de l'ensemble de ces mécanismes chez l'homme. Les différents modèles murins utilisés nous offrent la possibilité de décortiquer l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu lors d'une réponse immunitaire. Les souris conventionnelles (BALB/c et C57Bl6) et transgéniques (Langerin-DTR-GFP; Knock-out (KO) pour récepteurs chimiokines) nous permettent d'avoir une connaissance approfondie des mécanismes de la réponse immunitaire. L'ensemble du projet prend en compte la règle des 3R. Des tests in vitro sur cellules humaines ont été réalisés auparavant pour évaluer la non toxicité des vaccins utilisés, mais l'efficacité immunologique n'est réalisable que chez des êtres vivants. Nous utilisons les données de manière transversale entre les protocoles et les utilisateurs afin de réduire le nombre d'animaux et le nombre de groupes contrôle. Nous améliorons au maximum nos protocoles pour maîtriser la souffrance des animaux ainsi que les variations individuelles qui peuvent en découler. Les animaux sont hébergés dans les conditions d'hébergement et d'enrichissement adéquates de notre établissement avec un personnel dédié au soin et à l'expérimentation. Sur l'ensemble du projet (5 ans), et en prenant en compte la règle des 3R, nous utiliserons environ 585 souris, toutes lignées confondues. Ce travail sera donc un appui important à la recherche de protocoles thérapeutiques et préventifs contre des agents infectieux responsables de problèmes mondiaux de santé publique.

4622. La composition chimique des otolithes (petite pièce osseuse de l'oreille interne du poisson) varie en fonction de l'environnement chimique de l'eau dans laquelle les poissons évoluent. Par conséquent, les éléments incorporés de façon permanente dans l'otolithe peuvent servir d'empreinte biologique permettant à l'échelle individuelle de retracer la séquence des milieux utilisés par un poisson au cours de sa vie. Cependant, la dynamique d'incorporation des éléments dans les otolithes est pour le moment assez peu connue et les rares approches expérimentales soulignent unanimement que ce processus n'est pas instantané, mais au contraire qu'il peut être relativement long (de quelques dizaines de jours à plusieurs mois). Cette lente incorporation conduit inévitablement à un découplage temporaire entre la signature chimique des otolithes et celle du milieu environnant. De plus, de récentes études ont souligné que ce temps d'incorporation est extrêmement variable entre individus, sans que la cause ait pu être déterminée. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a jamais déterminé si la variabilité globalement observée est le résultat de caractéristiques individuelles propres à chaque individu, mais différentes entre individus ou si cette gamme de variation correspond à une gamme de réponses physiologiques dans laquelle chaque individu "tire" une valeur de façon imprévisible à chaque changement d'habitat. En d'autres termes, la question de l'individualité de la dynamique d'incorporation des éléments se pose. Cette distinction est fondamentale si l'on souhaite effectuer une analyse microchimique fine à l'échelle individuelle et change crucialement la façon d'analyser les données. Afin d'aborder la question de l'individualité, le processus de biominéralisation ne pouvant être reproduit en laboratoire (ex vivo), nous proposons une approche expérimentale visant à suivre individuellement et de façon répétée le temps d'incorporation des éléments dans l'otolithe chez des truitelles suite à un changement de la composition chimique du milieu. Ces données individuelles d'incorporation des éléments seront dans un deuxième temps corrélées au métabolisme propre à chaque individu qui aura préalablement été mesuré à l'aide d'appareils respirométriques.

Pour ce faire, 500 alevins seront initialement mis en élevage afin d'obtenir 200 truitelles qui seront introduites dans le dispositif expérimental (dont 160 analysées en respirométrie). Afin d'obtenir des mesures physiologiques les moins biaisées possible, les conditions d'élevages seront strictement contrôlées en fonction des besoins (nourriture, volume d'eau adapté, etc.). Toutes les manipulations seront conduites sur des individus préalablement anesthésiés afin de limiter la souffrance animale. En cas de comportement manifestement aberrant, les poissons impliqués seront euthanasiés.

4623. Notre société, prestataire de services en recherche préclinique, développe des modèles de recherche et propose un large panel de modèles in vivo adaptés pour des études de pharmacocinétique, de pharmacologie, d'évaluation de l'efficacité des composés thérapeutiques et pour la recherche translationnelle.

L'objectif de ce projet de recherche est de développer de nouveaux modèles expérimentaux les plus prédictifs possibles afin de mimer les pathologies humaines et de tester sur ces modèles de nouvelles thérapies anticancéreuses.

Dans les procédures réalisées sur les modèles animaux de cancers, les composés seront évalués dans un environnement physiologique. Cependant, les résultats de ces études ne sont pas toujours transposables à l'homme.

Pour cette raison, nous avons aussi développé sur des souris et des rats immunodéficients des modèles de xélogreffe de cellules cancéreuses ou des fragments de cancers obtenus à partir de patients. Ces modèles permettent de mieux évaluer l'efficacité des molécules destinées à traiter les cancers chez l'homme.

Des cellules ou des fragments cancéreux seront greffés en sous-cutanée, ou directement dans un tissu cible de la tumeur pour mieux simuler l'environnement originel du cancer. Les animaux seront ensuite traités avec de nouvelles thérapies anticancéreuses. Les animaux seront suivis individuellement et ils seront obligatoirement euthanasiés aux points limites définis dans chaque procédure.

Durant les cinq années de ce projet, nous allons utiliser 125000 animaux soit 105000 souris et 20000 rats.

Ces animaux seront utilisés dans six procédures multiples au cours desquelles seront évalués différents médicaments - Toxicité, pharmacodynamique, pharmacocinétique de composés thérapeutiques chez le rongeur porteur ou non de tumeur

- Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée en sous cutané

-Évaluation d'efficacité anti-tumorale de composés chez le rongeur porteur de tumeur (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient) greffée chirurgicalement dans différents organes cibles de la tumeur (greffe orthotopique).

-Évaluation d'efficacité anti-métastatique de composés chez le rongeur porteur de tumeur métastatique (lignée cellulaire ou fragment dérivé de tumeur de patient)

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.

4624. e développement et l'évolution des lésions athérosclérotiques résultent d'un processus lent et complexe au niveau des artères de gros ou moyen calibre. La détection de, et l'intervention précoce sur ce processus responsable de la majorité des décès par

maladie cardiovasculaire est un enjeu de santé publique considérable. L'identification de facteurs de risque précoces d'athérosclérose, ainsi que la compréhension des mécanismes moléculaires sous-tendant leur apparition, sont donc clefs dans la lutte contre l'athérosclérose. Dans ce contexte, la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD) revêt un intérêt majeur puisque des études épidémiologiques ont clairement identifié la NAFLD comme un facteur de risque précoce d'athérosclérose indépendant de l'obésité. La progression de la NAFLD, de la stéatose, simple accumulation bénigne d'acide gras dans le foie, vers un stade pro-inflammatoire (Non alcoholic steatohepatitis ou NASH), voire un stade fibrotique ou cirrhotique dans 10-30% des cas rend cette maladie redoutable en soi, et la découverte d'un NASH par des tests biochimiques ou échographiques doit aussi faire suspecter une possibilité de pathologie vasculaire à long terme. La relation de causalité entre NASH et athérosclérose est le sujet d'intenses débats, mais l'hypothèse que la production de facteurs pro-athérogéniques par le foie enflammé tels que la CRP, le fibrinogène, PAI-1 ... favorise la progression de la plaque athéromateuse est crédible, mais reste non démontrée.

Les études extensives menées par notre laboratoire identifient le récepteur nucléaire Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) comme une cible thérapeutique d'intérêt majeur dans ce champ pathologique. PPAR $\alpha$  est un récepteur nucléaire connu pour réguler l'utilisation des acides gras et réprimer les voies de signalisation pro-inflammatoires dans le foie. Nos travaux les plus récents ont montré pour la première fois que PPAR $\alpha$  inhibe la progression de la stéatose vers le NASH et la fibrose par un mécanisme anti-inflammatoire direct, indépendant de son effet sur le métabolisme lipidique hépatique dans un modèle murin de NASH. En utilisant un mutant de PPAR $\alpha$  possédant uniquement ces activités anti-inflammatoires et dont l'expression sera restreinte aux cellules hépatocytaires dans un modèle génétique murin d'athérosclérose et de NASH (PPAR $\alpha$  KO $\times$ LDL-R KO), nous évaluerons donc directement la contribution d'un processus inflammatoire hépatique à la progression de la plaque d'athérome aortique. Les déterminants moléculaires du processus inflammatoire hépatique seront identifiés par des études de génomique fonctionnelle, d'épigénomique et d'interactomique. L'évolution de la NASH sera suivie par transcriptomique à la fois dans le modèle murin et dans des cohortes de patients stratifiées par leur degré de NASH, afin d'identifier un (des) marqueurs prédictifs de l'évolution du NASH et sa corrélation avec les atteintes vasculaires.

Les études *in vitro* sur modèles cellulaires ont permis de cerner des mécanismes d'action probables. Le recours aux modèles animaux est nécessaire car ce projet étudie des interactions inter-organes non modélisables *in vitro* ou *in tubo*. Le nombre total de souris utilisées sera de 864 souris, nombre justifié ci-dessous sur le plan expérimental. Par ailleurs, il est important, s'agissant d'évaluer le métabolisme de nos souris, que les animaux soient maintenus dans des conditions d'hébergement dépourvus de stress, et que nos animaux soient maintenus dans un statut sanitaire excellent. Ainsi, la souffrance potentielle engendrée par les procédures mises en œuvre sera prise en charge grâce à l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques dès que nécessaire. La procédure d'euthanasie sera mise en œuvre sous anesthésie (animal inconscient). Enfin, le bien-être de l'animal depuis sa naissance jusqu'à sa mort sera pris en compte grâce à un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, la présence d'abris et de jeux dans les cages, une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, et la prise en compte de tout signe physique de stress ainsi que de la hiérarchie sociale.

4625. Le cancer ovarien est la première cause de mortalité des cancers gynécologiques. Le traitement de référence est une chirurgie associée à une chimiothérapie combinant des sels de platine et des taxanes. Si à l'issue de ce traitement les patientes entrent dans une phase de rémission apparente, la plupart récidivent dans les mois qui suivent. Le cancer est alors fréquemment devenu chimiorésistant contre les sels de platines. La nécessité de mettre en place des thérapies alternatives à la chimiothérapie de référence permettant de traiter ces patientes devenues résistantes est l'une des problématiques majeures dans la prise en charge du cancer ovarien.

Parmi les causes de l'apparition d'une chimiorésistance aux sels de platine, nous pouvons noter, entre autres, l'activation de voies de résistance à la mort cellulaire au sein des cellules tumorales. Cette activation peut venir de la cellule tumorale (mutations génétiques) mais également des cellules qui l'entourent (microenvironnement, comme nous l'avons montré au laboratoire dans le cancer ovarien. La présence des cellules du microenvironnement au voisinage des tumeurs peut empêcher la mort cellulaire induite par les chimiothérapies utilisées. Il convient donc de cibler et d'inhiber l'action des cellules du microenvironnement afin de rétablir la sensibilité des cellules tumorales ovariennes à cette chimiothérapie.

Nous avons récemment identifié les cellules du microenvironnement responsables de la chimiorésistance des cellules cancéreuses et nous pensons savoir quelle est la molécule sécrétée par ces cellules qui active les cellules cancéreuses. Nous avons obtenu un anticorps dirigé contre cette molécule et montré *in vitro* que l'inhibition de la molécule identifiée permettait de restaurer une chimiosensibilité des cellules cancéreuses au carboplatine. Cette levée de la chimiorésistance est observée même en présence des cellules du microenvironnement.

L'anticorps dont nous disposons a déjà une autorisation de mise sur le marché (AMM) chez l'homme pour des maladies inflammatoires. Il pourrait donc être facilement administré à des patients atteints de cancers des ovaires si il présentait la même action chimio sensibilisante vis-à-vis du carboplatine *in vivo*. Nous avons donc besoin de tester cet anticorps sur la progression tumorale et la chimiothérapie chez des animaux. Le modèle murin est approprié car nous pouvons induire le développement d'un cancer ovarien humain et ensuite traiter les souris avec la chimiothérapie conventionnelle ou la chimiothérapie conventionnelle plus notre anticorps. En effet, nous avons développé au laboratoire un modèle murin qui mime la pathologie humaine. Nous injectons des cellules cancéreuses ovariennes humaines à des souris immunodéficientes et les souris développent une pathologie similaire aux patientes. Ensuite nous évaluons les traitements envisagés pour traiter les patientes sur ces souris. Nous attendons la régression des tumeurs. Nous avons besoin d'utiliser 60 souris par expérience car nous allons évaluer différents types de traitements pour déterminer celui qui est le plus adapté en termes de sécurité et d'efficacité. Ce nombre a été déterminé car pour être validé le protocole doit être réalisé avec des groupes de 6 souris minimum. Le protocole n'est pas douloureux car nous savons que nos molécules ne sont pas toxiques aux doses utilisées. Nous surveillons les souris plusieurs fois par semaine pour s'assurer

qu'elles ne présentent aucun signe de souffrance. Les souris seront euthanasiées dès le développement de la pathologie dans les souris contrôles et avant que leur état général ne soit altéré afin de ne pas leur infliger de souffrance inutile. La réalisation de ces études chez la souris demeure ainsi la dernière partie du travail fondamental permettant de valider l'anticorps comme une molécule capable de sensibiliser les tumeurs ovariennes humaine à la chimiothérapie de référence (carboplatine) permettant ainsi d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer ovarien. Les souris seront traitées de la même manière qu'un patient le serait.

4626. Les progrès dans les connaissances physiopathologiques et de biologie moléculaire qui sous-tendent les différentes maladies permettent une prise en charge de plus en plus personnalisée des patients. Pour ce faire, les outils thérapeutiques sont de plus en plus associés aux outils diagnostiques, afin de pouvoir choisir les traitements les plus appropriés pour chaque patient, et adapter la stratégie thérapeutique à l'évolution sous traitement. L'imagerie moléculaire TEP/TDM joue un rôle important dans cette approche. Plusieurs traceurs sont disponibles en routine, mais dans certaines situations cliniques ils restent insuffisants. L'UCK est une plateforme d'imagerie isotopique par Tomographie par Emission de Positons expérimentale équipée d'une caméra microTEP/TDM. Elle accueillera plusieurs projets par en utilisant cette imagerie chez des modèle animaux murins (souris) de pathologies diverses en oncologie, neurologie et cardiologie induits dans les locaux des équipes de recherche utilisatrices du microTEP. Les objectifs de ces projets sont de 3 ordres :

- 1 - évaluer de nouveaux traceurs pour le diagnostic ou l'évaluation thérapeutique de pathologies
- 2 - caractériser au plan physiopathologique des modèles murins de façon longitudinale et non invasive
- 3 - évaluer de nouvelles thérapies de façon longitudinale et non invasives

Pour les objectifs 2 et 3, la TEP/TDM présente plusieurs avantages par rapports aux méthodes invasives : son innocuité pour l'animal, l'économie d'animaux car elle peut être répétée chez le même animal au cours du processus pathologique ou du traitement, et une meilleure puissance statistique car chaque animal constitue son propre témoin.

L'imagerie TEP/TDM comprend 2 procédures expérimentales de classe légère chez les animaux accueillis : l'administration de radiotraceurs émetteurs de positons et l'acquisition des images TEP et TDM sous la caméra, effectués sous anesthésie générale à l'isoflurane. Les animaux sont accueillis la veille de l'imagerie dans la pièce dédiée attenante à la salle caméra, pendant 24h (en cas de sacrifice) ou 48h.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet pour l'année 2017-2018 est de 150 souris soit 5 campagnes d'expérimentation animal (30 souris par campagne d'imagerie). Le même nombre d'animaux sera nécessaire pour les 4 années suivantes, soit un total de 750 souris.

L'objet de ce projet est l'évaluation du mode d'imagerie fonctionnel TEP. Ce type d'imagerie TEP, par rapport aux autres modalités d'imagerie du petit animal, constitue la modalité d'imagerie fonctionnelle la plus sensible et la plus quantitative ce qui permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires aux études.

Par ailleurs l'imagerie scintigraphique TEP est une technique non invasive nécessitant que les animaux soient anesthésiés pendant toute la durée de la procédure (anesthésie gazeuse avec 1-2% d'isoflurane) ce qui permet de limiter au maximum la douleur des animaux. Le nombre d'animaux nécessaire estimé est le plus faible possible tout en permettant l'aboutissement de ce projet.

Les animaux feront l'objet d'un suivi journalier. Tout constat de dépassement d'un point limite entraînera le retrait de l'animal de l'étude et son sacrifice puisque l'usage d'un analgésique compromettrait les résultats de l'étude. Les points limites seront : une perte de poids supérieure à 20% ; prostration de l'animal ; comportements stéréotypés de stress.

4627. L'être humain est soumis à l'alternance du cycle veille-sommeil. L'éveil est un état permettant la réalisation d'activités vitales et cognitives. Durant l'éveil le cerveau reçoit des informations internes et externes, les analyses pour y répondre de manière adaptée. Le sommeil lent est un état comportemental de repos, permettant à l'organisme d'assurer les régulations végétatives dans des conditions de dépense énergétique minimale. Le sommeil paradoxal quant à lui, est un état permettant des activités oniriques. Le sommeil a ses propres pathologies affectant la qualité de vie et la santé publique.

Notre objectif consiste à étudier les mécanismes centraux responsables du maintien de l'éveil. Dans cette étude, nous allons quantifier les différents stades de sommeil dans le cadre d'une étude pharmacologique. Les enregistrements polygraphiques continus ne peuvent être effectués qu'avec des électrodes implantées chirurgicalement.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement : 1) Remplacement : Le sommeil ne peut s'étudier que dans les conditions in vivo chez l'animal entier. Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil/rêve semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques régulant les états de vigilance. La propension du chat à dormir en fait un sujet expérimental idéal pour la recherche sur les mécanismes du sommeil. En effet, la connaissance actuelle, la théorie et hypothèse contemporaines sur le contrôle du cycle veille-sommeil ont été largement fondées sur les données obtenues chez le chat, d'où la raison de son utilisation répandue dans cette recherche. De plus, chez le chat nous pouvons distinguer 2 stades de sommeil lent, caractéristique proche de celui chez l'homme. 2) Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet (n=4) est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet. Les animaux pourront ensuite être réutilisés dans un projet ultérieur. 3) Raffinement : Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de la réussite de tous nos projets. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont optimisées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Durant les enregistrements l'animal est libre de ses mouvements. L'implantation des électrodes se fait sous

anesthésie générale par du personnel compétent. Après la chirurgie les animaux sont laissés au repos 1 semaine, pendant laquelle leur bien-être est surveillé quotidiennement.

4628. Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC), responsables de toxi-infections alimentaires pouvant évoluer vers des formes graves chez l'enfant (le syndrome hémolytique et urémique), sont un sous-ensemble des STEC (*Escherichia coli* producteurs de shigatoxines). Les souches EHEC, en particulier de sérotype O157:H7, sont considérées, en France, comme une préoccupation majeure de santé publique en raison de la gravité des syndromes engendrés. La contamination des aliments par ce type de bactéries a un impact potentiellement important pour les industries agro-alimentaires. Le principal réservoir de ces bactéries est le tube digestif des ruminants, en particulier des bovins. La contamination humaine se fait essentiellement par l'intermédiaire d'aliments d'origine bovine (viande, lait).

Bien que des études portant sur l'excrétion de ces pathogènes par les ruminants aient été publiées, peu de données sont disponibles sur leur survie et/ou leur croissance dans l'environnement digestif animal. Dans ce contexte, l'objectif principal de notre projet est de développer un modèle expérimental d'infection digestive par les EHEC qui permettra de mieux comprendre la physiologie et l'écologie des EHEC dans leur réservoir naturel : le tube digestif des bovins. Etant donné qu'actuellement il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de reproduire un environnement biologique aussi complexe que le tube digestif des ruminants, nous utiliserons pour cela de jeunes bovins, âgés de 3 à 5 mois.

Au total, 15 bovins, répartis en 3 groupes de 5 individus (nombre minimal pour pouvoir faire une comparaison statistique inter-groupes des résultats) seront inclus dans notre étude. Tous les animaux arriveront une semaine avant le début de l'expérimentation pour leur permettre de s'habituer à leur nouvel environnement et limiter le stress. Les animaux des deux premiers groupes seront hébergés sur caillebotis en animalerie confinée et inoculés par voie orale avec (i) soit la souche O157:H7 MC2 isolée en France par notre équipe (Groupe A), (ii) soit la souche O157:H7 EDL 933 isolée aux Etats-Unis et régulièrement utilisée en laboratoire (Groupe B). Le troisième groupe, dont les animaux seront hébergés sur aire paillée en animalerie conventionnelle et ne seront pas infectés, constituera le groupe témoin (Groupe T). Les animaux des trois groupes recevront une alimentation identique, constituée d'un aliment complet sous forme de granulés, de paille, et de minéraux sous forme de pierres à lécher.

Bien qu'aucun signe clinique ne soit attendu après inoculation, les animaux feront néanmoins l'objet d'une surveillance sanitaire quotidienne par une équipe de vétérinaires. En outre, un suivi sanguin hebdomadaire des paramètres hématologiques, rénaux et hépatiques permettra de détecter d'éventuelles conséquences biologiques de l'infection expérimentale. Par ailleurs, pendant une période de 21 jours après inoculation, des prélèvements de fèces seront réalisés quotidiennement pour le dénombrement des entérobactéries et des *E. coli* totales et de la souche O157:H7 inoculée pour les veaux en animalerie confinée. Les animaux seront réinoculés 21 jours après la première inoculation, puis seront euthanasiés par injection 4 jours plus tard. Leur autopsie, permettra le prélèvement des différents segments du tube digestif (contenu et paroi) et de fragments de peau.

Nous pourrions ainsi caractériser :

1. la persistance des EHEC, leur taux d'excrétion dans les matières fécales et la contamination des cuirs après administration orale aux animaux de manière contrôlée ;
2. l'adhésion et la colonisation des différents segments digestifs : dénombrement dans les contenus digestifs et adhésion à la muqueuse des différents compartiments digestifs de la cavité buccale au rectum ;
3. la physiologie des EHEC dans le tractus digestif : nutriments préférentiellement utilisés pour assurer leur survie dans les différents segments digestifs ;
4. l'expression de gènes impliqués dans la virulence, en particulier en relation avec l'efficacité de colonisation des différents sites par la souche d'EHEC ;
5. l'interaction du microbiote digestif avec les EHEC ; modification éventuelle de la diversité du microbiote endogène des différents segments digestifs par la présence de la souche EHEC.

Les résultats attendus du projet sont :

1. la validation d'un modèle animal bovin qui pourra être utilisé pour tester des moyens de lutte contre le portage et l'excrétion des EHEC. Ce modèle devrait en effet permettre d'évaluer ensuite de manière objective différentes stratégies pour diminuer le portage et l'excrétion des EHEC chez les bovins en élevage, afin de limiter le risque de contamination des carcasses à l'abattoir, comme, par exemple, l'administration de souches microbiennes antagonistes ou la modification du régime alimentaire dans la période précédant l'abattage des animaux.
2. des connaissances sur les besoins nutritionnels et la persistance des EHEC dans le tractus digestif animal,
3. des connaissances sur la colonisation et la répartition des EHEC dans les différents compartiments du tube digestif des bovins qui permettront d'adapter les mesures de maîtrise mise en œuvre à l'abattoir en cas d'accident d'éviscération,
4. des connaissances sur les mécanismes d'adhésion/colonisation des EHEC dans le tube digestif animal et sur l'expression, dans ce biotope, des gènes impliqués dans la virulence lors d'une infection chez l'homme. En effet, ces connaissances permettront en particulier de comprendre si le passage dans le tube digestif de l'animal prédispose les souches EHEC à survivre dans l'aliment puis à développer leur pouvoir pathogène chez l'homme.

4629. Le syndrome métabolique regroupe dans sa définition la présence de plusieurs anomalies métaboliques associées (obésité abdominale, hypertriglycéridémie, HDL-cholestérol bas, intolérance au glucose ou diabète de type 2, hypertension). Cette condition s'accompagne généralement d'une hépatopathie et résulte d'une altération du métabolisme glucido-lipidique qui permet l'installation d'un état inflammatoire chronique appelé stéatohépatite non alcoolique ou NASH. Cette condition est un vrai problème de santé sans traitement véritablement efficace. De plus, il favorise une évolution vers des stades peu voire non

réversibles comme la fibrose, la cirrhose et l'hépatocarcinome. Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire laissent fortement suggérer que la dermatopontine pourrait être un nouvel acteur dans le développement de la fibrose hépatique. A ce jour, il n'existe aucune donnée permettant de documenter ce rôle. Nous allons donc utiliser des souris dont le gène codant pour la dermatopontine a été inactivé, et nous allons caractériser leur sensibilité à des agents pro-fibrotiques. Le développement de la fibrose étant conditionné par des interactions inter-cellulaires dans le foie, ce processus n'est pas reconstituable in vitro et exige donc l'utilisation de modèles animaux. Nous avons néanmoins procédé à des expérimentations in vitro qui permettent de définir les processus engagés dans la fibrose et donc de limiter l'utilisation de souris (n=400) à son strict minimum. Par ailleurs, il est important, s'agissant d'évaluer le métabolisme de nos souris, que les animaux soient maintenus dans des conditions d'hébergement dépourvus de stress, et que nos animaux soient maintenus dans un statut sanitaire excellent. Ainsi, la souffrance potentielle engendrée par les procédures mises en œuvre sera prise en charge grâce à l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques dès que nécessaire. La procédure d'euthanasie sera mise en œuvre sous anesthésie (animal inconscient). Enfin, le bien-être de l'animal depuis sa naissance jusqu'à sa mort sera pris en compte grâce à un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes, la présence d'abris et de jeux dans les cages, une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, et la prise en compte de tout signe physique de stress ainsi que de la hiérarchie sociale.

4630. L'objectif de ce projet est de rechercher une éventuelle accumulation de gadolinium dans l'organisme suite à des administrations répétées de produits de contraste (chélates de gadolinium), lors d'examen IRM et l'éventuelle toxicité associée. Plusieurs publications mettent en évidence chez l'homme des zones d'hypersignal dans des régions du cerveau visibles par IRM suite à des injections multiples de produits de contraste gadolinés. De manière générale, la biodistribution à long terme des chélates de gadolinium dans l'ensemble de l'organisme est un sujet d'investigation continu.

Afin de répondre aux interrogations que soulèvent ces publications et aux questions posées par les autorités de santé, nous proposons un projet préclinique pour:

- Mettre en évidence chez l'animal des hypersignaux en IRM liés à l'accumulation de Gd
- Démontrer le lien entre les zones d'hypersignal observées en IRM et l'accumulation de gadolinium dans ces mêmes structures.
- Etudier si la rétention de Gadolinium est liée, ou non, à la structure des produits
- Etudier le mécanisme impliqué.
- Rechercher une éventuelle toxicité

Les espèces rat et souris ont été choisies car ce sont des espèces de référence pour toutes les études de toxicité exploratoire, qui permettent facilement une imagerie par résonance Magnétique.

Le nombre global de rongeurs sur les 5 années du projet est de 800 (200 souris et 600 rats), de façon à évaluer le risque de chacun des produits de contraste à base de gadolinium présents sur le marché, de décrire le mécanisme d'accumulation du gadolinium et la potentielle toxicité liée à sa présence.

Les procédures expérimentales mises en œuvre au cours de ce projet seront réalisées sous analgésie et anesthésie, gazeuse ou chimique (excepté pour certaines injections intraveineuses). Elles seront menées dans le respect des bonnes pratiques des associations de professionnels ou bien ou des textes de références sur les volumes et les conditions d'injection. Les mêmes animaux serviront pour répondre à plusieurs questions scientifiques (imagerie, comportement, dosages, études d'histologique) afin de limiter le nombre total d'animaux.

4631. Le microbiote ruminal et le comportement alimentaire sont deux points clés de la régulation de l'ingestion chez les ruminants et le maintien d'une bonne santé digestive. Chez la souris, il a été montré que la multiplication de certaines souches bactériennes de l'intestin déclenche un signal de satiété et réduit l'ingestion de l'hôte. Aucun résultat n'est disponible chez les animaux d'élevage. L'objectif de cette étude est donc d'explorer le lien entre comportement alimentaire du jeune ruminant et les caractéristiques de son microbiote ruminal, pour identifier certains types de microbiote modulant la prise alimentaire.

Nous prévoyons de prélever à l'aide d'une sonde gastrique 10 mL de contenu ruminal de 80 agneaux de race Romane appartenant pour moitié à 2 lignées sélectionnées de façon divergente sur leur efficacité alimentaire. Les prélèvements auront lieu 2 fois dans la vie de l'animal, à chacune des 2 phases d'alimentation post-sevrage : à 20 semaines d'âge lorsque les animaux sont alimentés avec 100% de concentrés, puis lors de la phase d'alimentation à base de fourrages à environ 34 semaines d'âge. Par séquençage du jus de rumen, les quantifications relatives des bactéries du contenu ruminal seront analysées. Les données d'ingestion collectées permettront de caractériser la prise alimentaire des agneaux (nombre de repas par jour, quantité ingérées au repas, vitesse d'ingestion...). Une prise de sang sera faite à chaque agneau pour caractériser le génome de l'animal.

Grâce aux données collectées, nous allons pouvoir tester l'existence d'un lien entre le comportement alimentaire de l'agneau ingérant du concentré et les populations bactériennes présentes dans son rumen. Après passage à une ration à base de fourrages, nous observerons l'évolution de ce microbiote et de l'efficacité alimentaire de l'agneau, et testerons de nouveau l'existence d'un lien entre types de microbiote et comportement alimentaire. L'appartenance de ces agneaux à des lignées divergentes permettra aussi d'apprécier l'impact d'une sélection sur l'efficacité alimentaire sur le comportement alimentaire et sur le microbiote de l'animal.

3R :

- Nous estimerons la valeur génétique du comportement alimentaire des agneaux (index de la vitesse d'ingestion et du fractionnement des repas) ce qui permet de caractériser plus finement les animaux qu'avec un simple phénotype et ainsi limiter l'effectif mesuré à 80 animaux.

- Afin de limiter le stress de contention, les prélèvements seront réalisés par du personnel qualifié à l'aide d'une cage de contention adaptée aux ovins et à laquelle les animaux sont habitués. Seuls 2 prélèvements seront réalisés par animal à l'issue des phases d'ingestion de concentrés puis d'une ration à base de fourrages. Lors du prélèvement du contenu ruminal, si un liquide séreux ou sanguin remonte dans la sonde, le prélèvement est stoppé et l'animal est retiré du projet et mis en surveillance.
- Aucun modèle alternatif ne permettant d'étudier le lien n'entre comportement alimentaire et microbiote, le recours aux animaux est inévitable.

4632. L'objectif du projet est de tester la capacité de cellules souches limbiques (CSL) humaines en thérapie cellulaire de perte de vision. Pour cela, nous produisons des CSL à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et les comparons à des CSL somatiques isolées en culture primaire de cornées adultes. In vitro les différents types cellulaires seront déposés sur des gels de fibrine puis greffés sur du stroma cornéen (suture) de souris nude immédiatement après avoir induit une déficience limbique (destruction des cellules de manière mécanique et chimique). Ces procédures sont de sévérité modérée. 136 animaux seront consacrés pour l'ensemble des phases du protocole, conférant la possibilité de mettre en évidence une différence d'expression en cellules souches greffées avec une puissance de 95% et un risque alpha de 0.05. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin du protocole pour permettre l'analyse histologique. La prise de la greffe sera analysée par histologie et marquage en immunohistochimie. Cette étude a été conçue en tenant compte de la règle des 3R. Remplacement : Nous avons réalisé le maximum des expériences in vitro, qui ont été fait l'objet de publications, et seules restent à faire les expériences in vivo pour passer aux essais thérapeutiques chez l'homme. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de ces modèles, l'utilisation des méthodes statistiques nous permettra une exploitation maximale des données obtenues par expérience afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser (136 animaux pour les 2 ans que durera ce projet). Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux. Une surveillance journalière sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique (prostration, alimentation, hygiène) non améliorée par les antalgiques ou en cas de complication locale (infection, perforation) seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction.

4633. 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.

4634. A 17 ans, 31,5 % des jeunes sont fumeurs quotidiens, les prédisposant à une addiction à l'âge adulte. Il est crucial de comprendre les effets de la nicotine (molécule addictive du tabac) chez l'adolescent. Pour répondre à cette urgence, nous étudierons l'effet de la nicotine chez le rongeur adolescent. Nous avons montré que le système endogène ciblé par le cannabis, le système endocannabinoïde (EC), régule la consommation de nicotine via le contrôle de l'aire tegmentale ventrale où sont situés les neurones dopaminergiques (DA). L'activité des neurones DA définissant les effets addictifs de la nicotine, le projet aura pour objectifs: 1) caractériser les adaptations comportementales, les altérations cellulaires et neurochimiques du système DA chez les animaux soumis à la nicotine à l'adolescence et à l'âge adulte; 2) Examiner le rôle du système endocannabinoïde dans les différents effets de la nicotine. Notre objectif est d'appliquer des pratiques en expérimentation animale qui sont en accord avec la règle des "3R" de Russel et Burch. Celle-ci propose: 1/ de Réduire le nombre d'animaux en expérimentation; 2/ de Raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") et 3/ de Remplacer les modèles animaux dès que possible. Ne pouvant pas remplacer les modèles animaux dans notre projet, nous nous attachons donc à



réduire le nombre d'animaux en expérimentation, et à raffiner nos procédures. Concernant la réduction du nombre d'animaux, les analyses statistiques que nous employons dans nos études visent à limiter au strict minimum le nombre d'animaux utilisés, tout en garantissant la significativité de nos résultats. Ainsi, nos protocoles expérimentaux et les méthodes d'analyses statistiques employés sont pensés au préalable de la phase d'expérimentation, nous permettant ainsi d'éviter la répétition inutile d'expériences ou l'emploi d'un nombre inapproprié d'animaux. Pour ce projet, les expériences comportementales auront pour effectif final n= 188 rats et n= 614 souris (calcul détaillé dans le logigramme).

4635. La toux est un mécanisme essentiel de protection des voies aériennes. Ce réflexe de défense complexe a pour objectif d'expulser les corps étrangers et les particules inhalées accidentellement et de lutter contre l'accumulation de sécrétions bronchiques. Quelques épisodes de toux « physiologique » sont ainsi produits chaque jour de manière normale, en dehors de toute affection chronique respiratoire, pour assurer cette fonction de clearance.

Néanmoins, la toux peut également avoir des effets néfastes. Au-delà de la dissémination possible d'agents infectieux, l'aspect chronique de la toux est souvent très invalidant et peut affecter de manière importante la qualité de vie des personnes qui en souffrent, voire même aggraver la pathologie qui en est à l'origine.

La toux constitue en effet un symptôme associé à de nombreuses pathologies. Le tabagisme est en effet une des principales causes de toux de longue durée. L'asthme, les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et le reflux gastro-œsophagien constituent également des causes fréquentes de toux persistante. Elle peut aussi être liée à la prise de certains médicaments comme on peut classiquement l'observer avec les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC).

D'un point de vue physiologique, le réflexe de toux est déclenché par la stimulation mécanique ou chimique de récepteurs localisés au niveau du larynx, de la trachée ou des bronches proximales. Plusieurs types de récepteurs sont impliqués dans le déclenchement de la toux ; on citera notamment les « Slowly Adapting Pulmonary Stretch Receptors » ou SARs et les « Rapidly Adapting Pulmonary Stretch Receptors » ou RARs. Le message afférent généré au niveau de ces récepteurs est alors véhiculé, principalement par la voie vagale, jusqu'au bulbe et plus exactement le noyau du tractus solitaire (NTS). Ce message intégré au niveau central emprunte alors les voies efférentes constituées par le nerf phrénique, pour le diaphragme, les nerfs spinaux pour les muscles expiratoires et les nerfs laryngés pour la glotte, pour déclencher le réflexe de toux. Au-delà de ce schéma décrivant de manière assez simpliste la cascade d'événements qui conduisent à la production de toux, les mécanismes locaux qui conduisent à l'activation de ces différents récepteurs et le rôle joué par les différents médiateurs libérés localement ne sont pas clairement élucidés. Associés au fait que les causes possibles de la toux sont extrêmement variables, ceci explique probablement les difficultés à mettre en place des traitements antitussifs réellement efficaces.

Si l'on tient compte de l'ensemble de ses étiologies, la toux constitue l'un des plus fréquents motifs de consultation médicale. La prévalence de la toux chronique est estimée à 6 % des consultations de médecine générale, et à 10 à 30 % des consultations de pneumologie. Aux Etats Unis, la toux chronique représente 10 à 38% des consultations ambulatoires pour un pneumologue tandis qu'en Grande-Bretagne, le nombre de prescriptions d'antitussifs atteint 3 millions/an, soit un budget annuel de 2,8 millions d'euros. Comme évoqué précédemment, les antitussifs actuellement disponibles, qu'ils agissent au niveau périphérique ou central, n'apportent pas de réponse clairement satisfaisante chez l'ensemble des patients ; leur utilisation pouvant même être contre-indiquée dans certains cas ou s'accompagner d'effets secondaires.

Compte tenu des éléments précédemment évoqués, il apparaît clairement que les efforts engagés pour tenter de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à mieux contrôler la toux, doivent être poursuivis. Compte tenu de la complexité de ce réflexe, ces développements passent par la réalisation de tests sur des modèles animaux, aussi prédictifs que possible. Dans cette optique, différents modèles animaux ont été développés. Le modèle de toux induite par inhalation d'acide citrique chez le cobaye compte parmi les modèles les plus classiquement utilisés et fait l'objet du présent projet.

Dans le cadre de ce protocole, différentes procédures vont être mises en place pour évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les animaux recevront le candidat médicament par voie orale, intranasale, intrapéritonéale ou sous-cutanée, avant que le test de toux lui-même ne soit réalisé. La toux est induite classiquement chez l'animal par une exposition de courte durée à de l'acide citrique, nébulisé dans l'enceinte dans lequel il se trouve pendant le test. Pour limiter le stress des animaux, les administrations intranasales seront réalisées sous anesthésie générale.

Dans le cadre de cette procédure, différentes actions ont été envisagées dans le cadre de l'application de la règle des 3Rs. Ces tests sont notamment réalisés à l'aide d'une technique de mesure parfaitement non-invasive (plethysmographie corps entier) et une habituation est préalablement mise en place pour que les animaux se familiarisent avec l'environnement nouveau dans lequel ils seront placés pendant le test (enceinte de plethysmographie). Enfin, le nombre d'animaux est limité au maximum notamment parce qu'ils seront ré-utilisés dans plusieurs séries expérimentales.

Par ailleurs, ce protocole est parfaitement non invasif et ne génère aucune douleur notable chez l'animal. L'irritation générée par l'acide citrique, et ayant pour but de déclencher le réflexe de toux, disparaît rapidement, comme attesté par la disparition du réflexe au cours des quelques minutes qui suivent la fin du test.

Le nombre cobayes inclus dans ce projet a été déterminé par un calcul de N : 60 par série expérimentale pour un total de 20 séries sur 5 ans, soit 1200 tests. Le terme de "test" est utilisé ici, et pas "animaux", car dans le cadre de ces études, et compte tenu du fait que la technique de mesure utilisée est non-invasive, les animaux ne seront pas mis à mort et seront réutilisés dans plusieurs séries expérimentales.

4636. Le développement de futurs candidats médicaments en cancérologie nécessite une succession d'études permettant de mettre en évidence l'efficacité du composé, anticiper les éventuels effets secondaires et déterminer les conditions optimales de traitement.

Le candidat médicament est d'abord évalué *in vitro* sur des cultures cellulaires, puis il est ensuite nécessaire d'étudier le comportement de la molécule dans un organisme vivant le plus prédictif possible : c'est pourquoi nous avons recours à l'utilisation d'animaux. Les résultats obtenus détermineront la voie d'administration, la dose et le temps de traitement adaptés à la pathologie et permettront d'extrapoler les conditions optimales d'utilisation chez l'homme, pré-requis obligatoire pour l'autorisation d'essai clinique chez l'homme.

L'objectif de ce projet est de déterminer la distribution d'une nouvelle classe de molécules dans un organisme vivant suite à une administration par différentes voies en fonction du temps et de la dose et de déterminer la fenêtre thérapeutique de ces composés. Ces informations sont indispensables pour optimiser l'utilisation de ces molécules, anticiper les éventuels effets secondaires et transposer ces conditions optimisées pour une utilisation chez l'homme.

Ces études seront réalisées sur des souris immunocompétentes et nécessiteront un nombre total de 930 souris sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée de la façon suivante dans ce projet :

-Remplacement : Le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude ne se fait qu'après pré-validation des candidats *in vitro* sur des modèles cellulaires adaptés. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce modèle pour l'obtention de résultats scientifiques exploitables.

-Réduction : Le design de l'étude permet l'utilisation d'un nombre d'animaux réduit à 5 par groupe et composé de 8 groupes.

-Raffinement : Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal et les animaux sont hébergés en présence d'enrichissements. De plus les animaux sont suivis quotidiennement afin de vérifier qu'ils ne développent pas de complications (de type infection ou léthargie irréversible) suite au traitement.

4637. L'ocytocine et la vasopressine sont deux hormones secrétées par le cerveau et connues pour être impliquées dans les comportements sociaux et affectifs (empathie ou agressivité, relation mère-enfant, choix des partenaires, stabilité du couple ...). De nombreuses études cliniques sont actuellement menées chez l'homme dans lesquelles l'ocytocine est utilisée dans l'espoir de corriger les troubles de l'humeur ou les comportements sociaux, en particulier dans les cas d'autisme ou du syndrome de Prader Willi. Cependant, le mode d'action de ces deux hormones dans le cerveau est inconnu, qu'il s'agisse de la localisation des zones activées ou des mécanismes moléculaires mis en jeu. Ce projet vise à déterminer le mode d'action de ces deux hormones dans une région cérébrale particulièrement impliquée dans la régulation des comportements sociaux : le Septum latéral. La première partie du travail est menée sur une préparation *in vitro* permettant de remplacer l'utilisation d'animaux intacts. Les premiers résultats indiquent que les deux hormones modulent l'activité des neurones dans cette structure et, surtout, régulent leurs rythmes d'activité électrique. Nous savons qu'au cours d'un comportement social, l'activité du cerveau change de façon notable ce qui engendre des changements dans l'électroencéphalogramme. Le septum étant l'une des structures cérébrales impliquées dans la régulation de l'électroencéphalogramme, la compréhension du mode d'action de ces hormones dans cette structure passe par une analyse de leur influence sur les rythmes électro-encéphalographiques enregistrables sur des souris libres de leurs mouvements, en interaction ou non avec des congénères. L'objet de la présente demande, qui concerne 140 animaux en tout, consiste donc en une série d'expérimentations au cours desquelles l'électroencéphalogramme de souris éveillées sera enregistré avant, pendant et après injection de solution saline, d'ocytocine, de vasopressine ou de leurs antagonistes dans le septum latéral. D'autre part, des traceurs fluorescents injectés dans différentes régions cérébrales permettront d'analyser la circuiterie locale dans les actions de l'ocytocine et de la vasopressine dans le septum. Pour ces expériences, chaque souris servira de test et de contrôle (injections unilatérales, applications successives des hormones et solutions salines) afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour atteindre des résultats statistiquement significatifs. Ces résultats devraient améliorer notre connaissance du mode d'action central de ces deux hormones et servir de base pour raffiner les protocoles utilisés actuellement chez l'homme de façon empirique pour traiter des pathologies rares mais très invalidantes comme l'autisme ou le syndrome de Prader Willi. Les souris seront élevées avec libre accès à l'eau et à la nourriture. L'enrichissement sera représenté par des copeaux de bois ajoutés à la sciure dans la cage, ainsi qu'un carré de cellulose. Toutes les expériences que nous pratiquerons sur les souris suivront les recommandations du Gircor (Guide l'évaluation éthique) et de la Charte pour une éthique de l'expérimentation animale. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, les mesures suivantes seront prises : les animaux seront opérés sous anesthésie gazeuse ou intrapéritonéale selon les cas ; après la chirurgie les animaux seront maintenus en atmosphère humide et chauffée jusqu'au réveil. Si les animaux ont perdu du sang pendant la chirurgie, nous administrerons une solution saline en sous cutané. Les animaux seront ensuite stabulés en cage individuelle transparente et suivis quotidiennement pour des signes de détresse/infection/souffrance. Un analgésique (ibuprofène~50-80 mg/kg/jour) sera administré dilué dans l'eau des biberons pour éviter la douleur possible liée à la cicatrisation du site d'injection. Les animaux montrant d'éventuels signes d'infection (écoulement, rougeur ou enflure à niveau de la zone de cicatrisation) seront traités avec des antibiotiques (amoxicilline 50 mg/kg/jour) dans l'eau de boisson.

4638. Le nombre de médicaments à l'origine de perturbations ou d'atteintes gastro-intestinales est en croissance constante. L'apparition d'ulcères gastriques et la perturbation de la motricité intestinale comptent ainsi parmi les effets indésirables les plus fréquents.

On sait par exemple depuis longtemps que la plupart des anti-inflammatoires non stéroïdiens, peuvent entraîner fréquemment des effets indésirables gastro-intestinaux allant de l'érosion de la muqueuse gastrique à la perforation et à l'hémorragie. Ces mêmes médicaments, mais aussi de nombreux antibiotiques par exemple, peuvent également être à l'origine de diarrhées. Par ailleurs, certains médicaments antidépresseurs, antihypertenseurs, anticoagulants ou antalgiques peuvent être à l'origine de l'apparition d'une constipation, pouvant devenir chronique. C'est le cas notamment des opioïdes qui entraînent presque systématiquement une

constipation pouvant rapidement devenir extrêmement désagréable, voire même dangereuse. D'autres médicaments (neuroleptiques, certaines classes de molécules utilisées pour le traitement de la maladie de Parkinson, etc ...) ont également pour effet secondaire l'apparition de constipation.

L'étude des effets secondaires digestifs de candidats médicaments est envisagée très tôt dans le processus de développement du médicament et font l'objet de tests complémentaires décrits dans les textes réglementaires issus de la conférence internationale de l'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement d'un nouveau médicament destiné à l'usage humain (ICH7A). Dans cette optique, différents tests in vivo ont été développés chez le rat pour évaluer, de manière simple, les effets de candidats médicaments sur la vidange gastrique, la motricité intestinale et leurs éventuels effets ulcérogènes. Ces mêmes tests sont également utilisés pour tester l'efficacité d'un candidat médicament dont la fonction est de ralentir ou accélérer le transit intestinal ou la vidange gastrique ou encore de protéger la muqueuse gastrique.

Compte tenu de la complexité du système digestif, et de la possibilité d'une action directe, mais aussi indirecte sur ce système, ces évaluations nécessitent la réalisation de tests sur animal entier, qui font l'objet du présent projet.

Nos données préliminaires réalisées avec des composés de référence administrés chez l'homme nous ont, également, permis un calcul de la taille de la cohorte optimale pour ces expériences permettant de limiter le nombre de rongeurs sans diminuer pour autant la puissance de nos analyses.

Ainsi, en tant que prestataire de services pour les laboratoires qui développent des candidats médicaments, une moyenne de 3 études est réalisée par an ce qui amène à  $n = 300$  rats seront utilisés pour ces 3 protocoles confondus sur 2 ans. Concernant les signes de reconnaissance de la douleur chez le rongeur, nous nous référons à la grille de MORTON et GRIFFITHS, 1985 modifiée. En effet, nous nous focalisons sur l'apparence de l'animal, son examen clinique dans sa cage, l'abreuvement et l'alimentation, le comportement naturel et provoqué. Selon les scores seuils atteints, il y a un déclenchement de décisions (normal, utilisation d'antalgiques appropriés ou euthanasie si le point limite est atteint). Pour finir, des mesures seront prises pour éviter toute sorte de souffrance et respecter le bien-être des animaux.

4639. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament d'un point de vue pharmacologique, pharmacocinétique et toxicologique. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament ; elles répondent à des normes internationales de qualité scientifique et sont étroitement évaluées par les autorités de santé au moment de délivrer l'AMM. Parmi, ces études, les études de pharmacocinétique permettent de décrire le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit d'étudier son absorption, sa distribution dans l'organisme, son métabolisme c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin à son élimination. Ainsi, les études de pharmacocinétique ont pour but de fournir les connaissances nécessaires à l'adaptation de la posologie pour obtenir les concentrations plasmatiques d'un médicament entraînant l'effet optimum, c'est-à-dire la meilleure efficacité avec le minimum d'effets indésirables. La pharmacocinétique repose sur l'étude de la variation de la concentration plasmatique du médicament, seul paramètre facilement accessible en fonction du temps. La concentration plasmatique d'un médicament dépend des conditions de son administration, unique ou répétée, de la voie utilisée et du nombre de compartiments dans lesquels il se distribue. Ces études sont le plus souvent réalisées chez le rongeur avec l'utilisation de plusieurs voies d'administration et à plusieurs concentrations. Pour une étude classique de pharmacocinétique chez le rongeur réalisée sur 24 ou 48h incluant 8 temps en moyenne de prélèvements sanguin en moyenne, utilisant par exemple, les voies intraveineuse (IV) et orale (PO) avec un composé candidat à 3 doses, 3 rats sont utilisés par dose et par voie, soit 18 rats au total à inclure pour la réalisation d'une telle étude.

Chez la souris, et compte tenu de la volémie plus réduite, la collecte de l'ensemble des échantillons de sang ne sera pas réalisée chez le même animal. On inclura donc en général 3 animaux par temps de prélèvement, soit 144 animaux pour la même série expérimentale.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet est donc de 18 rats ( 3 rats pour chaque dose administrée par la voie orale + 3 rats pour chaque dose administrée par la voie intraveineuse) et 144 souris (3 souris par temps de prélèvement et pour chaque dose administrée par la voie orale et idem pour la voie veineuse) par série expérimentale soit, pour un total de 25 séries sur 5 ans, 450 rats ou 3600 souris (soit au maximum 4050 rongeurs confondus).

Ces études de pharmacocinétiques réalisées in vivo chez le rongeur seront réalisées par un personnel ayant reçu une formation spécifique et un certain nombre de mesures a été mis en place afin d'éviter toute souffrance et respecter le bien-être des animaux. Les animaux seront observés cliniquement tout au long des sessions de prélèvement sanguin et, le point limite a quand, à lui été fixé sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance de MORTON et GRIFFITHS 1985 modifiée.

4640. La directive cadre européenne sur l'eau (DCE), transposée en droit français en 2004, vise la préservation et la restauration des milieux aquatiques et l'atteinte du bon état des eaux au plus tard en 2027. En France, la loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA) de 2006 apporte des outils permettant une meilleure mise en œuvre de cette directive. La notion de continuité écologique introduite dans la DCE est réaffirmée dans la LEMA et concerne notamment la libre circulation des organismes aquatiques et leur accès aux zones indispensables à leur reproduction, leur croissance, leur alimentation ou leur abri. Les nouveaux classements introduits par la LEMA et déclinés dans le code de l'environnement demandent l'équipement de nombreux ouvrages hydroélectriques pour assurer la montaison et la dévalaison des poissons. Les cours d'eau classés situés dans les zones de montagne présentent des peuplements piscicoles majoritairement constitués de truites. Même si la biologie et l'écologie de cette espèce ont été largement étudiées, les connaissances sur son comportement migratoire en rivière de montagne restent parcellaires, principalement concernant la dévalaison.

Les expérimentations se dérouleront dans un cours d'eau des Alpes, au niveau de deux prises d'eau équipées chacune d'un dispositif de montaison et d'un dispositif de dévalaison. Les objectifs sont : 1/ d'identifier les stades de truite et les périodes de migration des truites en rivière de montagne ; 2/ d'identifier les facteurs environnementaux qui influencent ces phénomènes ; 3/ de quantifier la fraction d'individus migrants et sédentaires dans la population de truites en place ; 4/ d'évaluer la franchissabilité des passes à poissons et des systèmes de dévalaison au niveau des deux prises d'eau.

Le projet propose d'étudier sur une durée de 3 ans le comportement migratoire d'un échantillon de 3000 truites sauvages (1000 truites par an) marquées à l'aide de puces RFID (PIT tags) et détectées à l'aide d'antennes de détection fixes. Les antennes seront positionnées dans les dispositifs de franchissements piscicoles aménagés au niveau des prises d'eau des centrales électriques. Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recours à des poissons sauvages pour étudier leur comportement in natura. L'effectif de 3000 individus est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population et pour évaluer la variabilité interannuelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (règle des 3R : Réduction). En effet, seule une fraction minoritaire des individus va migrer, l'autre fraction est résidente et ne sera pas détectée. Les marques PIT tags seront implantées dans la cavité péritonéale par une incision minimale (quelques mm) ne nécessitant pas de point de suture. Les animaux seront anesthésiés lors de l'opération, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-opératoire assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel (règle des 3R : Raffinement). Les implantations des marques seront réalisées par du personnel expérimenté au marquage des poissons.

4641. La cachexie associée au cancer ou au sepsis (syndrome d'infection générale et grave de l'organisme par des germes pathogènes) est un syndrome regroupant plusieurs symptômes, caractérisé notamment par une perte de poids corporel dramatique. Celle-ci résulte principalement d'une perte de masse adipeuse et de masse musculaire, appelée cachexie. La cachexie liée au cancer et au sepsis réduit la qualité et la durée de vie des patients et peut diminuer l'efficacité des traitements. De plus, la fatigue induite par les traitements de chimiothérapie et l'incapacité à réaliser des contractions musculaires volontaires qui résulte de la sédation et/ou de la ventilation mécanique imposée au patient en soins intensifs exacerbent les dysfonctions musculaires. Ainsi, la possibilité d'augmenter l'activité musculaire par l'intermédiaire de stimulations électriques (ou électrostimulation neuromusculaire) appliquées à la surface de la peau pourrait être une stratégie efficace pour lutter contre ces atteintes musculaires. La mise en évidence d'un bénéfice de l'électrostimulation musculaire (ESNM) sur ces pathologies graves nécessite le recours aux animaux (souris). L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est : 1) d'évaluer si un entraînement par ESNM permet de limiter les effets délétères du syndrome cachectique associé au cancer et au sepsis sur le fonctionnement du muscle squelettique, et 2) le cas échéant d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires qui expliquent ce bénéfice. Le développement de nouvelles méthodes de reconditionnement physique est primordial afin d'augmenter l'activité musculaire chez ces patients sévèrement atrophés et déconditionnés à l'effort. Si la compréhension des mécanismes sous-jacents sera en partie analysée via l'utilisation de cultures cellulaires, l'étude du bénéfice de l'ESNM ne peut être réalisée qu'in vivo, en conditions physiopathologiques in vivo, et ce à l'aide des modèles adéquats.

Ce projet est divisé en 4 procédures et mobilisera 1446 souris, y compris les individus reproducteurs.

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 analyses statistiques des expériences passées de l'équipe et des données de la littérature. Les tissus musculaires des animaux sont prélevés et conservés dans une banque biologique constituée dans le laboratoire, permettant de réutiliser les tissus pour des analyses ultérieures sans recours à des animaux supplémentaires. Les accouplements sont optimisés afin de produire le nombre nécessaire de souris. Le dispositif expérimental d'électrostimulation est non invasif et permet ainsi un suivi longitudinal des animaux, permettant de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés.

- 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. Aussi, le suivi de critères précis permet de mettre à mort rapidement les animaux présentant un phénotype dommageable. Ainsi, une grille de score permet d'éviter toute souffrance inutile et de prendre les mesures adéquates selon l'évolution du tableau clinique de chaque animal.

4642. Chez les équins, le parasitisme pose problème en termes de santé et de production. Certains vers parasites du tube digestif, les petits strongles, sont responsables de maladies graves pouvant conduire à la mort des animaux. Les traitements vermifuges utilisés pour contrôler ces parasites deviennent de moins en moins efficaces avec l'apparition de vers résistants du fait de leur utilisation massive. Le nombre de molécules disponibles sur le marché pour traiter ces maladies étant limité, il est actuellement nécessaire de repenser les schémas de traitement qui sont pour le moment systématiques. L'objectif est de proposer des méthodes de contrôles alternatives qui prennent en compte les exigences de la profession (santé des animaux, rentabilité), sociétales (préservation de l'environnement) et biologiques (limiter l'apparition et la dispersion de vers résistants). Pour cela, l'une des possibilités repose sur l'utilisation raisonnée des traitements. Néanmoins, nous ne disposons actuellement pas de biomarqueur(s) permettant de déceler une infestation précoce. De plus, les petits strongles ont la capacité de s'enkyster dans la muqueuse intestinale durant la période hivernale pour ressortir massivement au printemps induisant des diarrhées et coliques sévères pouvant conduire à la mort de l'animal. Cette phase est très mal connue et les facteurs influençant l'enkystement des larves restent inconnus.

Dans un protocole précédent, nous avons recherché des biomarqueurs d'infestations durant la saison de pâture qui doivent maintenant être validés dans le cadre d'une infestation expérimentale. Concernant l'enkystement larvaire, la photopériode à laquelle sont soumis les animaux semble jouer un rôle important. Nous devons néanmoins vérifier les données obtenues dans la première expérimentation.

Ainsi, dans ce projet, nous utiliserons 30 ponettes Welsh âgées de 2 à 5 ans.

Les animaux, tous déparasités en septembre 2016, entreront en conditions expérimentales 3 mois plus tard, soit fin décembre. Après contrôle coproscopique, les animaux des lots infestés recevront une dose de 30000 larves infestantes de cyathostomes per os (intubation), en une seule prise. Entre J0 et J70, 4 prélèvements de matières fécales et de sang seront fait pour 1- contrôler la charge parasitaire de chaque animal et 2- réaliser les analyses de sang. Les prélèvements sur les animaux exposés à la lumière naturelle seront utilisés pour valider les biomarqueurs identifiés en 2015. Par ailleurs, les prélèvements sur les deux lots d'animaux en photopériodes variables seront utilisés pour évaluer l'impact de la photopériode sur l'enkystement des larves de parasite.

Le principe des 3R est appliqué comme suit :

Réduire : une analyse de puissance a été réalisée à partir des données sur les marqueurs sanguins et métabolomiques de 2015. Pour obtenir une puissance de 90% avec un risque de 5%, 10 ponettes/lot sont suffisantes pour réaliser la validation.

Remplacer : La validation des biomarqueurs ainsi que l'étude de l'enkystement du parasite dans son hôte ne peuvent être réalisées qu'en conditions expérimentales réelles, sur les animaux hôtes.

Raffiner : Les ponettes au box auront à disposition des brosses afin que les animaux puissent se gratter

- 4643. Mots-clés: cryptosporidiose, veau, agneau, *Cryptosporidium* spp.

- Raison du projet : Chez le veau et l'agneau non sevrés, la cryptosporidiose est reconnue comme un agent causal majeur de diarrhée néonatale. Elle entraîne de forts taux de morbidité et de mortalité au sein des exploitations et par conséquent, des pertes économiques majeures pour les éleveurs. La maladie est causée par des protozoaires parasites du genre *Cryptosporidium*. Parmi les espèces infectant les jeunes ruminants, *C. parvum* est la plus fréquemment retrouvée et la plus pathogène. La contamination des jeunes se fait par ingestion d'oocystes (œufs de *Cryptosporidium*) présents dans l'environnement. Actuellement, peu de traitements efficaces contre la cryptosporidiose sont disponibles en France.

- Objectif du projet : Reproduire expérimentalement l'infection à *Cryptosporidium* spp. chez le veau et l'agneau dans le but d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de médicaments vétérinaires sur animal malade.

- Bénéfices attendus du projet : 1) Développement et caractérisation de modèles expérimentaux de cryptosporidiose chez le veau et l'agneau non sevrés.

2) Evaluation de produits vétérinaires (prophylactiques ou thérapeutiques) sur animal malade pour des études règlementaires (dossier d'autorisation de mise sur le marché) ou à but de recherche.

- Animaux : Le veau et l'agneau non sevrés sont les espèces sensibles et correspondent à l'épidémiologie de la pathologie sur le terrain. 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. Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. Généralement, s'agissant d'études comparatives, 2 à 5 groupes seront constitués, le nombre d'animaux par groupe sera compris entre 4 et 20, soit un effectif maximum de 100 animaux par étude. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 1, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 500 animaux maximum sur la période de 5 ans.

- Dommages attendus : La souffrance attendue est sévère et correspond à la pathologie induite par l'infection par *Cryptosporidium* spp. (diarrhée profuse et aqueuse, pouvant s'accompagner de léthargie, d'anorexie, de douleurs abdominales et de déshydratation, pouvant aboutir à la mort de l'animal). Les signes cliniques sont attendus 3 à 5 jours après inoculation du parasite et peuvent durer 4 à 18 jours selon la sévérité de l'infection.

- Application des 3Rs :

. Remplacement : aucune méthode alternative à l'utilisation d'animaux vivants n'est susceptible de répondre aux objectifs du projet.

. Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

. Raffinement : l'hébergement sera adapté aux besoins physiologiques des animaux et permettra l'expression de leur gamme normale de comportements. La contention visera à minimiser le stress et le bien-être sera évalué bi-quotidiennement par le personnel en charge des animaux.

4644. Les stimuli sensoriels externes (auditifs, visuels ...) sont des informations transformées par les organes sensoriels (cochlée [oreille], rétine ...) en influx nerveux. C'est sous cette forme qu'ils parviennent au cerveau, où ils vont être traités par des zones dites sensorielles primaires. Ce premier niveau de traitement de l'information sensorielle est suivi immédiatement par d'autres niveaux d'analyse, d'interprétation et d'intégration des informations qui arrivent au cerveau. Ces autres niveaux de traitement de l'information neuronale font également appel à d'autres fonctions du cerveau tels que l'attention, la mémoire, l'apprentissage. Le mécanisme neuronal mis en œuvre par le cerveau pour l'encodage de ces fonctions cognitives reste mal connu. Il représente un défi majeur en neurosciences car il en va de notre perception du monde extérieur. De plus, la comparaison de ce mécanisme neuronal de la cognition chez le primate non humain et chez l'Homme permettra de mieux comprendre l'unicité du cerveau humain. Ce projet s'inscrit dans la suite de travaux réalisés par notre équipe sur les mécanismes de l'encodage neuronal de la conscience et des séquences abstraites. L'activité neuronale sera mesurée par les moyens de l'imagerie cérébrale par IRM fonctionnelle (IRMf, mesurant indirectement l'activité cérébrale en mesurant), par électroencéphalographie (EEG, mesurant directement l'activité électrique cérébrale) et par la neurophysiologie (enregistrement intracrânien, mesurant directement l'activité

électrique neuronale unitaire ou des champs locaux). L'étude de l'activité cérébrale sera réalisée à l'état éveillé ainsi que sous anesthésie générale afin de déterminer le rôle de la conscience dans le traitement cérébral de l'information sensorielle. Le projet cherchera à comparer l'activité cérébrale obtenue chez le primate non humain avec celle obtenue chez l'Homme et menée en parallèle dans le cadre d'études cliniques.

Le travail a pour objectif d'élucider les mécanismes cérébraux de la perception auditive et visuelle (séquences de stimuli visuels et/ou auditifs) chez le modèle primate non humain conscient et après suppression de la conscience par anesthésie générale. Celui-ci présente des similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'Homme, et la taille de son cerveau est compatible avec l'utilisation des équipements requis (IRM, respirateur, etc.) et la complexité des stimuli sensoriels proposés. C'est également le modèle le plus utilisé en neurosciences, ce qui permettra des comparaisons avec d'autres études dans le monde. Ce projet implique 8 animaux, tous issus d'un élevage autorisé et dédié à des études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

L'état de santé des animaux sera contrôlé de manière régulière avec une attention particulière au bien-être animal. Les méthodes expérimentales proposées ne présentent aucun danger pour l'animal grâce à des critères drastiques d'arrêt en cas de signes de souffrance qui ont été préalablement déterminés. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par un vétérinaire avant d'être réalisés par un médecin hospitalier spécialement formé. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis continuellement pendant les examens.

4645. De nombreuses situations mènent à un déconditionnement osseux important telles que l'immobilisation, un style de vie sédentaire, ou la microgravité ou encore certaines maladies chroniques qui mènent à l'obésité. Ce déconditionnement se caractérise par une perte de masse, un changement de structure et des modifications métaboliques du tissu osseux, le tout augmentant, in fine, le risque fracturaire.

Notre étude a pour but d'analyser la mort des cellules enfouies dans l'os (ostéocytes), les modifications de la vascularisation de la moelle osseuse et du tissu osseux et l'infiltration graisseuse de la moelle dans un modèle d'immobilisation de l'arrière train de souris. Ces paramètres étant susceptibles d'être influencés par l'âge et le sexe, nous étudierons des souris mâles et femelles adultes et âgés. Nous voulons analyser les liens entre tous ces événements et leur séquence d'apparition chez des souris adultes normales. De plus nous avons des souris génétiquement modifiées qui présentent un syndrome métabolique sans adipocytes (et donc sans obésité associée) qui nous permettront d'analyser les conséquences d'une absence de gras dans l'adaptation osseuse à l'immobilisation. Nous voulons aussi vérifier dans quelle mesure la mort des ostéocytes est responsable de l'absence de récupération osseuse après une période d'immobilisation en bloquant le processus qui mène à la mort ostéocytaire (blocage de l'apoptose).

Pour cela, nous avons besoin de 2 procédures expérimentales permettant 1/ de déterminer la cinétique des événements osseux précités et les interrelations entre l'apparition de la graisse médullaire et de la mort ostéocytaire et 2/ de tester si la prévention de la mort ostéocytaire limite ou prévient la perte osseuse et l'invasion lipidique suite à l'immobilisation et suite à une période de récupération. Pour obtenir 3 temps de cinétique chez des mâles et des femelles et à 2 âges différents nous estimons que 644 animaux seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 5 ans. Pour nos expérimentations nous avons prévu le nombre nécessaires d'animaux à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats et pour pallier l'exclusion de certains individus dans l'expérimentation.

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire 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.

- « 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 des animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le poids corporel sera mesuré tous les deux jours. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ( $\geq 20\%$  du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système osseux et vasculaire intra osseux. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte osseuse. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent pour la physiologie osseuse et avons choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles.

Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont. Par ailleurs, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi (copeaux, 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.

4646. L'athérosclérose est la première cause de mortalité dans le monde. Les facteurs de risques associés à l'athérosclérose sont bien connus, le principal étant l'hypercholestérolémie. Cependant, ces facteurs n'expliquent pas toujours les variations inter-individuelles. Selon l'hypothèse de Barker formulée en 1993, des facteurs environnementaux agissant durant la période fœtale et périnatale, peuvent induire des altérations prédisposant au développement souvent précoce de maladies cardiovasculaires plus tard dans la vie adulte. Des études cliniques chez l'homme montrent que la présence d'une hypercholestérolémie chez la mère pendant la gestation pourrait avoir un impact sur le développement de l'athérosclérose chez la descendance.

Lors d'une étude préliminaire, nous avons mis en évidence que le hamster nourri avec un régime hyperlipidique développe, au bout de 2 semaines, une accumulation de cholestérol aortique, réversible par un traitement avec l'extrait liquide de la spiruline. Ce dernier est issu d'une microalgue (*Arthrospira platensis*) riche notamment en phycocyanine, un puissant antioxydant. Cela est concordant avec des articles montrant une augmentation du stress oxydant associé au développement de pathologies cardiovasculaires.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact d'une intervention nutritionnelle en extrait liquide de spiruline durant la gestation sur les variations de la cholestérolémie et sur le développement de l'athérosclérose sur la descendance chez la souris apoE<sup>-/-</sup>. Une concentration journalière de spiruline (5,5 g/kg) sera administrée durant la gestation ou durant la gestation et l'allaitement, puis nous investiguerons les mécanismes potentiels sous-jacents. Cette recherche fait suite à une étude plus large, dont la saisine a été déposée en novembre 2014, dans laquelle nous avons mis en évidence que les souris apoE<sup>-/-</sup> nées de mères hypercholestérolémiques développent plus d'athérosclérose que les souris du même génotype nées de mères normocholestérolémiques. Le modèle d'étude est donc déjà en place au laboratoire et opérationnel. Cette expérience requiert 135 souris apoE<sup>-/-</sup>, soit 27 animaux adultes et nous prévoyons 108 descendants théoriques.

La règle des 3R sera respectée :

Réduction : Le nombre de souris a été réduit au minimum pour permettre une bonne évaluation statistique d'une intervention nutritionnelle entre deux groupes indépendants sur le développement de l'athérosclérose (test Mann-Whitney).

Remplacement : Seule une étude in vivo, c'est-à-dire incluant la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors du développement de maladies métaboliques, peut permettre d'atteindre l'objectif de ce projet. Aucune méthode de remplacement ne peut donc être employée.

Raffinement : Les animaux ne subiront que très peu de contraintes et la douleur sera minimisée. Les cages seront enrichies (papier et/ou carton), les rares prélèvements de sang seront effectués au niveau de la queue ou de la veine submandibulaire sous anesthésie à l'isoflurane. La mise à mort sera effectuée par dislocation cervicale. Les souris seront surveillées quotidiennement. Dans le cas de toute modification physique ou comportementale, la surveillance sera accentuée et les souris seront soignées et/ou placées sous antidouleurs afin de minimiser toute souffrance, détresse ou inconfort. Les prélèvements de sang seront stoppés momentanément jusqu'au rétablissement de l'animal. Enfin, si l'animal ne parvenait pas à se rétablir, la mise à mort serait envisagée.

4647. Les carcinomes épidermoïdes (HNSCC), qui sont des tumeurs malignes, représentent 90% des cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS). Cette pathologie constitue le 6ème type de cancer le plus fréquent dans le monde. Particulièrement liés à l'environnement, les principaux facteurs de risque sont la consommation d'alcool, de tabac et l'infection par virus de type Papilloma (HPV). Ces facteurs participent à une augmentation de l'intolérance à des traitements souvent toxiques et à une diminution de leur efficacité. La survie de ces cancers ne s'est malheureusement pas améliorée au cours des 10 dernières années et ce malgré un effort constant d'adaptation des traitements.

Le cetuximab, anticorps monoclonal anti-EGFR, est actuellement la seule thérapie ciblée approuvée pour le traitement des patients HNSCC, il peut être prescrit seul ou en association avec une radiothérapie pour les tumeurs localement avancées, ou en combinaison avec une chimiothérapie à base de platine pour des maladies récurrentes / métastatique.

Il a été montré au cours de ces dernières années que les effets anti tumoraux du cetuximab pouvaient aussi provenir de sa capacité à agir sur le système immunitaire.

Par conséquent, il est très intéressant de potentialiser l'action du cetuximab contre les cellules tumorales en stimulant le système immunitaire. Pour cela de très nombreuses molécules sont actuellement en cours de développement par les grands groupes pharmaceutiques, ces nouvelles molécules font partie d'une nouvelle catégorie de traitement : l'immunothérapie.

Dans ce projet nous allons développer un modèle murin qui nous permettra de tester ces nouveaux traitements, nous permettant ainsi de comprendre leur mécanisme d'action, les raisons des résistances à l'immunothérapie tout en déterminant les associations qui peuvent augmenter l'efficacité des traitements et donc augmenter la survie des patients tout en améliorant leur qualité de vie en diminuant les effets secondaires liés à l'escalade des doses.

Cette étude va être réalisée sur des souris car c'est un modèle classique pour l'étude de nouveaux traitements en cancérologie.

En effet ces modèles permettent d'intégrer toutes (ou presque) les caractéristiques de la pathologie humaine

- Relation entre les cellules stromales et les tissus normaux, notamment le stroma et le système immunitaire

- Mesure à la fois de l'efficacité et de la toxicité des traitements

- gain de temps dans la validation préclinique

- Etude des phénomènes de dissémination métastatique

- Etude des phénomènes de résistance à la chimiothérapie

Le modèle que nous avons sélectionné est un modèle syngénique murin (HNSCC) car les souris doivent posséder un système immunitaire fonctionnel ce qui est le cas des C3H, l'ensemble de cette étude sera réalisée sur 300 animaux et dans le respect de l'éthique et du bien-être animal.

Pour réduire au maximum ce nombre d'animaux des études in vitro permettent de réduire l'intervalle des doses de médicaments qui sont testées dans les procédures pilote. De plus les cellules SCCVII injectées ont été modifiées afin de porter le gène de la

Luciférase permettant ainsi de réaliser un suivi de la croissance tumorale par imagerie IVIS (pas de sacrifice pour des mesures de croissance tumorale et groupes plus homogènes limités à 10 animaux par condition). Les animaux (5 animaux/cage) sont dans des cages enrichies, avec nourriture et boisson ad libitum. Les animaux seront acclimatés pendant une semaine puis contrôlés quotidiennement (grille de score) et pesés tous les 2 jours afin de s'assurer que le développement tumoral ne les empêche pas de s'alimenter correctement. Tout animal présentant des signes de souffrance sévères sera euthanasié.

4648. Les cancers du sein, sont la première cause des décès liés au cancer dans le monde occidental chez la femme. Ces cellules tumorales, issues de la transformation des cellules épithéliales constituant la glande mammaire, possèdent un fort potentiel à envahir et à coloniser des organes secondaires comme les poumons ou le foie processus communément appelé métastase. Ce potentiel métastatique est fortement influencé par l'environnement, et notamment par des cellules du sein, 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 général du 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. 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.. D'autre part 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 démontrent que l'utilisation de 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 bloque la progression tumorale. Dans ce contexte, nous nous proposons d'étudier les effets de ces molécules in vivo. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'implantation de cellules tumorales murines dans la glande mammaire par injection sous anesthésie générale chez des souris femelle (Balb/C) âgées d'au moins 8 semaines (glande mammaire mature). Pour les besoins de l'étude, les souris seront implantées avec des cellules tumorales non invasives (67NR) en présence de fibroblastes (les rendant ainsi localement invasives [tissus environnant] mais non métastatique [organe secondaire : poumon, foie...]) ou avec des cellules tumorales invasives et métastatiques (4T1). Cette étude permettra de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques anti-métastatiques potentielles pour le traitement de patients atteints de carcinomes à fort pouvoir métastasant.

Pour répondre aux exigences des 3R, le suivi quotidien des animaux sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller objectivement l'état des animaux (Raffinement). Les souris seront sacrifiées 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, une ulcération de la tumeur ou l'apparition de métastases interférant avec l'activité de l'animal (gène respiratoire). Seules des micro-métastases pulmonaires par les cellules 4T1 sont attendues (aucune métastase par les cellules 67NR) environ 21 jours après implantation, aucun phénotype respiratoire n'est néanmoins attendu jusqu'à 29 jours. 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). Nous avons choisi d'utiliser un modèle murin car il permet de récapituler fidèlement les différentes étapes de la progression tumorale observé chez l'Homme. De plus ce modèle est couramment utilisé en laboratoire permettant ainsi de générer des résultats pouvant être comparé à ceux obtenus par d'autres équipes. Aussi souvent que possible, les expériences seront réalisées in vitro sur des cellules en culture (Remplacement). Cependant, la complexité d'une tumeur, de par la présence de nombreux types cellulaires d'origine 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 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 360.

4649. L'arthrose est une dégénérescence qui conduit à une destruction plus ou moins rapide du cartilage articulaire et constitue la seconde cause d'invalidité après les maladies cardio-vasculaires. En France, 5 millions de personnes sont concernées par cette pathologie. Les cellules souches mésenchymateuses (CSMs) semblent être de meilleures candidates que les chondrocytes autologues pour une thérapie cellulaire ciblée du cartilage. Une nouvelle source de CSMs a été récemment mise en évidence dans le liquide synovial. Ces CSMs d'origine synoviale présentent plusieurs avantages : 1) elles peuvent être prélevées lors des épanchements dans l'arthrose, 2) elles permettent d'utiliser des cellules autologues, 3) elles ont déjà une origine articulaire donc sont déjà dans les conditions particulières de l'articulation. Une étude pilote chez quelques patients traités avec des CSMs de moelle osseuse par injection intra-articulaire a permis de montrer une amélioration progressive et rapide de la fonction articulaire. L'objectif de notre projet consiste à étudier les capacités des CSMs d'origine synoviale pour une thérapie ciblée des lésions diffuses du cartilage in vivo dans un modèle de section du ligament croisé antérieur chez le rat immunodéprimé à 28 jours et 56 jours après l'induction du modèle d'arthrose.

Pour cela, 48 rats immunodéprimés (NUDE Crl:NIH-Foxn1<sup>rnu</sup>), séparés en 6 groupes de 8 animaux, seront utilisés dans cette étude:

Groupe 1 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie et une injection intra-articulaire de sérum physiologique à 1 et 2 semaines après la chirurgie. Mise à mort des animaux 28 jours après l'induction du modèle d'arthrose.

Groupe 2 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie (ouverture chirurgicale de l'articulation) et une injection intra-articulaire de sérum physiologique à 1 et 2 semaines après la chirurgie. Mise à mort des animaux 56 jours après l'induction du modèle d'arthrose.



Groupe 3 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie, une section du ligament croisé antérieur (LCA) et une injection intra-articulaire de sérum physiologique à 1 et 2 semaines après la chirurgie. Mise à mort des animaux 28 jours après l'induction du modèle d'arthrose.

Groupe 4 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie, une section du LCA et une injection intra-articulaire de sérum physiologique à 1 et 2 semaines après la chirurgie. Mise à mort des animaux 56 jours après l'induction du modèle d'arthrose.

Groupe 5 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie, une section du LCA et une injection intra-articulaire de CSMs issues du liquide synovial humain en suspension dans du sérum physiologique à 1 et 2 semaines après la chirurgie. Mise à mort des animaux 28 jours après l'induction du modèle d'arthrose.

Groupe 6 : sur le genou droit, nous procéderons à une arthrotomie, une section du LCA et une injection intra-articulaire de CSMs issues du liquide synovial humain en suspension dans du sérum physiologique à 1 et 2 semaines après la chirurgie. Mise à mort des animaux 56 jours après l'induction du modèle d'arthrose.

Deux procédures seront donc réalisées : 1) L'arthrotomie associée ou non à une section du ligament croisé antérieur sous anesthésie générale et antalgie, 2) Les injections intra-articulaires de CSMs synoviales humaines sous anesthésie gazeuse.

L'arthrose est une maladie invalidante mais elle ne peut conduire à la mort de l'animal. Dans notre pratique, les rats ne boitent plus dès le lendemain de l'intervention, ce qui justifie une antalgie péroopératoire et pendant les 48 heures suivantes. Cependant nous surveillerons quotidiennement les animaux et ceux qui présenteront des anomalies du comportement (vocalise, piloérection, cachexie) et/ou une perte de poids supérieure à 20% (sur une semaine sans reprise de poids) seront mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. L'apparition d'une infection articulaire (tuméfaction de l'articulation et boiterie) consécutive à l'intervention (en pratique quasi nulle) nous obligera aussi à mettre à mort l'animal.

Même si des expériences peuvent être menées sur des modèles cellulaires, le modèle animal est indispensable pour connaître les effets de cette thérapie cellulaire dans la réparation du cartilage. Enfin, dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum et est nécessaire et suffisant pour les études statistiques (Réduction). De plus, seul le côté droit sera opéré de façon à conserver le genou gauche comme témoin ce modèle de section du ligament croisé antérieur chez le rat est un modèle connu et maîtrisé d'arthrose (Raffinement). A la fin de l'étude, soit 28 jours ou 56 jours après opération, tous les animaux seront mis à mort selon la méthode réglementaire. Les genoux seront prélevés de façon à effectuer les études histologiques et immunohistologiques pour évaluer la gravité des lésions en fonction de la thérapie réalisée.

4650. Notre groupe s'intéresse aux pathologies chroniques du rein conduisant à l'insuffisance rénale terminale, pour laquelle les seuls traitements sont la dialyse et la transplantation. Les mécanismes conduisant à la progression des lésions rénales et à l'insuffisance rénale terminale ne sont pas connus et représentent des cibles thérapeutiques. Déchiffrer ces mécanismes est un des défis majeurs de la recherche en néphrologie.

Les pathologies humaines rénales chroniques peuvent être mimées chez les rongeurs, en particulier chez la souris, par une uni-néphrectomie (ablation d'un rein).

Les expériences menées trouvent leur justification dans la nécessité de comprendre les mécanismes physiopathologiques conduisant aux lésions rénales dans l'espoir de développer de nouveaux médicaments permettant de limiter la survenue de l'insuffisance rénale terminale. L'uni-néphrectomie chez la souris est un des modèles intégrés reproduisant assez fidèlement un certain nombre de caractéristiques de la pathologie humaine et de ce fait est très informatif.

CYP26A1, REST et Fam134b sont des protéines qui participent à l'homéostasie cellulaire en modulant la croissance cellulaire, l'adhésion et la transmission du signal.

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle de ces protéines dans la progression des lésions rénales. Nous anticipons que la perte d'expression de chacune des protéines favorisera le développement de lésions rénales accélérées. Ces données nous permettront de comprendre précisément leurs rôles dans l'adaptation à la réduction néphronique.

Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées, dont l'expression de CYP26A1, REST ou Fam134b aura été invalidée spécifiquement dans les cellules rénales. Ces souris ont déjà été rapportées dans la littérature et ne présentent pas de phénotype spontané particulier. Le nombre d'animaux est justifié par la nécessité d'atteindre des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de souris utilisé sera de 72 au total. n=12 par groupes= n=36 WT, 12 CYP26A1<sup>-/-</sup>, 12 REST<sup>-/-</sup>, 12 Fam134b<sup>-/-</sup>.

Nous appliquerons donc la règle des "3R" avec:

1-le nombre minimal d'animaux pour avoir la puissance statistique,

2-nous remplacerons dès que possible les expériences animales par des expériences in vitro. Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe pas de méthodes alternatives pour réaliser ce travail. Dans un contexte de recherche physiopathologique, l'expérimentation animale ne peut en aucun cas être remplacée par des expériences in vitro, où les cellules sont sorties de leur environnement.

3-Enfin, pour éviter toute douleur à l'animal, la néphrectomie est réalisée sous anesthésie générale, les animaux sont attentivement surveillés et des antalgiques sont prévus en post-opératoire

Les résultats obtenus permettront d'améliorer la connaissance et très certainement le traitement des maladies rénales chroniques.

4651. Le projet s'inscrit dans une thématique générale d'évaluation de multiples interventions susceptibles de moduler l'homéostasie générale des muqueuses et les réponses immunes locales et systémiques, en conditions basales et divers contextes physio-pathologiques chez la souris. L'étude permettra de renseigner sur l'efficacité de traitements préventifs ou thérapeutiques ainsi que la compréhension des mécanismes associés aux protections mises en évidence, en particulier en modifiant transitoirement ou durablement la structure du microbiote intestinal et/ou l'immunité de l'individu. Il s'agit d'un projet intégré

combinant de nombreuses procédures distinctes, rassemblées ici, ayant pour la plupart déjà fait l'objet d'autorisations antérieures, en vue d'un renouvellement.

Les interventions envisagées comprennent (i) des conditions nutritionnelles, consistant en l'apport de microorganismes de qualité alimentaire (vivants, inactivés ou sous forme de fractions), de matrices alimentaires, de fibres polysaccharidiques (prébiotiques), vitamines ou minéraux, seuls ou en combinaisons, tous considérés comme sans dangers ; (ii) d'immunisations par microorganismes vivants, inactivés ou sous forme de fractions purifiées.

Les divers contextes physio-pathologiques modélisés sont (i) des colites expérimentales induites chimiquement (DSS et TNBS), mimant les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ; (ii) des infections à tropisme intestinal via plusieurs microorganismes (*Citrobacter rodentium*, *Salmonella enterica* ser. typhimurium, *Escherichia coli* spp et *Yersinia pseudotuberculosis*), mimant la durée de colonisation, l'invasion de la muqueuse, la dissémination dans les organes et la composante inflammatoire associée.

Ces études documentent ainsi les potentialités anti-inflammatoires, et anti-infectieuses, de stratégies nutritionnelles ciblées (probiotiques, prébiotiques, métabolites alimentaires) et vaccinales, en considérant le rôle du microbiote intestinal. Enfin, l'utilisation de lactobacilles bioluminescents pour déterminer la persistance et la localisation des bactéries lactiques dans le tractus digestif par imagerie est également considérée.

Ces évaluations précliniques n'interviennent toutefois qu'après détermination préalable des effets *in vitro* (effets anti-inflammatoires, effets prébiotiques, chélation des métaux lourds), afin de limiter au mieux le nombre d'animaux (Réduire). Il n'est en effet pas possible de reproduire la physiologie intégrée et complexe du dialogue entre le système immunitaire, la muqueuse intestinale et le microbiote digestif de mammifère (Remplacer). Les procédures sont définies au mieux pour offrir le maximum de confiance dans les résultats générés dans le respect du bien-être des animaux en limitant la souffrance animale (Raffiner)

Le nombre total d'animaux sur les 5 ans à venir est estimé au maximum à 3 000 souris.

4652. Les études réglementaires de pharmacocinétique et de bioéquivalence sont requises par la loi. Elles respectent ainsi 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 de pharmacocinétique permettent d'étudier le devenir d'une substance active contenue dans un médicament après son administration dans l'organisme. Elles permettent notamment de déterminer les paramètres pharmacocinétiques suivants : absorption, distribution, métabolisme et élimination. Les études de bioéquivalence ont pour objectif d'obtenir des paramètres pharmacocinétiques permettant la comparaison de la biodisponibilité d'une substance active entre deux ou plusieurs formulations et / ou entre deux ou plusieurs voies d'administration.

Les animaux inclus dans ces études recevront un traitement conformément aux voies d'administrations, aux doses et aux schémas posologiques recommandés. Afin de déterminer les paramètres pharmacocinétiques et/ou la biodisponibilité des médicaments vétérinaires, divers prélèvements biologiques seront réalisés sur les animaux. A l'issue de ces études, certains animaux pourront être mis à mort afin de respecter le principe de précaution.

Conformément aux lignes directrices en vigueur, la détermination des paramètres pharmacocinétiques doit être effectuée *in vivo* sur l'espèce cible. Ainsi, 160 bovins, 160 porcins, 160 ovins, 160 caprins, 160 équins, 160 volailles, 160 lapins et 160 lamas pourront être inclus dans ces études sur 5 ans. En effet, en moyenne, 2 groupes de 8 animaux sont inclus dans les études de pharmacocinétique et de bioéquivalence et il est réalisé 2 études par an de pharmacocinétique ou de bioéquivalence sur chacune des espèces.

Afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation sera dispensée avant traitement. Tout au long de leur hébergement, les animaux auront des conditions d'hébergement adaptées et optimales (logement, environnement, alimentation, apport en eau, soins). Afin de les maintenir, elles seront vérifiées quotidiennement. De plus, afin d'augmenter leur bien-être, les animaux disposeront d'un environnement enrichi. Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

4653. L'épilepsie est une maladie neurologique fréquente, affectant 1% de la population avec 100 nouveaux cas par an et pour 100 000 habitants. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de cette maladie potentiellement grave et invalidante, sont encore mal connus et les traitements médicamenteux actuels sont essentiellement symptomatiques. Des études récentes ont relevé l'existence de processus inflammatoires au niveau du cerveau de patients présentant des épilepsies du lobe temporal. La protéine TSPO est considérée comme un marqueur de la neuro- inflammation et peut être tracée *in vivo* par imagerie de Tomographie par Emission de Positons (TEP). Ainsi le projet vise non seulement de mieux comprendre les mécanismes de l'épilepsie mais aussi d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques potentielles ciblant l'inflammation.

L'objectif est de caractériser et de quantifier les processus inflammatoires en suivant la protéine TSPO dans un modèle préclinique d'épilepsie chez le rongeur lors de la mise en place des processus qui déclenchent les crises puis lors de la phase d'aggravation du processus épileptique en vue de transposer les résultats en clinique humaine. Aujourd'hui aucun dispositif *in vitro* ou numérique ne permet de modéliser la complexité du cerveau humain. Le recours aux animaux est donc indispensable en veillant à en minimiser le nombre au moyen du suivi des mêmes animaux au cours du temps.

Pour mener à bien cette étude, un modèle animal de l'épilepsie est généré par injection stéréotaxique de kainate sous anesthésie générale et des imageries PET du TSPO (technique non invasives pour l'animal) seront réalisées à différents temps post-injection.

Nous aurons recours à 50 rongeurs, nés et élevés à des fins scientifiques dans un établissement agréé. Ce nombre a été réduit à un minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats suffisamment robustes pour ne pas compromettre la validité des expériences. L'état de santé des animaux sera surveillé au quotidien tout au long de l'étude et des critères d'arrêt ont été définis pour intervenir de manière appropriée lors de signes de souffrance. Les animaux sont hébergés en groupe sociaux dans des hébergements enrichis par des objets adaptés à leurs besoins spécifiques pour favoriser leur bien-être

4654. Les anticorps monoclonaux constituent la classe de molécules thérapeutiques prescrites croissant le plus rapidement. Ils correspondent dorénavant à près de 10% du marché mondial des médicaments. Les applications majeures sont en oncologie, en maladies inflammatoires et auto-immunes.

Le principe de base de notre technologie est d'isoler des lymphocytes B naturels produisant des anticorps à potentiel thérapeutique. Ceci requiert nécessairement l'utilisation d'animaux qui constituent la seule source de cellules B naturelles. Les anticorps naturels présentent a priori moins de risque de toxicité que des anticorps synthétiques ce qui les rend davantage compatibles pour les applications thérapeutiques chez l'homme.

Ce nouveau projet a pour but la mise au point d'une nouvelle technologie pour isoler des anticorps thérapeutiques à partir de répertoires immunitaires d'animaux. En comparaison avec les techniques standard du domaine dans l'industrie pharmaceutique (par exemple : hybridomes), cette nouvelle technologie permet de cribler jusqu'à >1000 fois plus efficacement et 10 fois plus rapidement les répertoires animaux et donc de réduire considérablement à terme l'utilisation d'animaux pour ces applications thérapeutiques.

Ce projet répond à ces besoins en développant un système ultra-haut débit pour identifier des anticorps pour le diagnostic et la thérapie.

Nous utilisons soit des cellules soit des antigènes pour immuniser les souris ou rats. Pour notre projet, le nombre total d'animaux nécessaire est de 400 souris, 300 rats sur 5 ans. 40 antigènes seront utilisés pour l'immunisation dans ce projet.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Une grille d'observation des signes cliniques et l'arbre décisionnel correspondant est mis en place afin de limiter la douleur, d'optimiser le bien-être animal et de pratiquer au plus tôt une euthanasie éthique.

4655. Le paludisme est une parasitose potentiellement mortelle qui a conduit à 500 000 décès environ en 2015. L'efficacité des traitements antipalustres est confrontée à la mise en place de mécanismes de résistance parasitaires. La mise au point de nouveaux traitements passe par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette affection. La réponse inflammatoire constitue la première réaction de l'organisme à l'infection et participe à l'élimination des parasites via des mécanismes de l'immunité innée tels que la phagocytose des globules rouges infectés ou leur destruction par la production de radicaux oxygénés. Cependant, dans le cas d'un paludisme sévère, cette réponse inflammatoire peut se révéler délétère, participant à la lésion d'organes vitaux. Le but de ce projet consiste à comprendre la cinétique de la réponse inflammatoire au cours de l'infection palustre, son rôle dans l'élimination des parasites, et les possibilités pharmacologiques pour orienter cette réponse et limiter cette infection.

Pour ce travail, un total de 1418 souris C57BL/6 sera utilisé. La règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) sera appliquée dans le cadre de ce projet. Le principe de remplacement n'est malheureusement pas applicable dans cette étude qui nécessite une approche in vivo permettant d'étudier la complexité des interactions hôte-pathogène. Cependant, les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Enfin, 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.

4656. Ce projet concerne l'efficacité d'un produit immunologique destiné à protéger une espèce de carnivore domestique contre une maladie mortelle.

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 conduites 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 40 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,
- l'hébergement des animaux en groupe sera favorisé de manière à diminuer leur stress
- recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, afin de réduire le stress des animaux.

4657. L'objectif du projet est de mieux comprendre les mécanismes physiologiques qui sont à la base de la variation interindividuelle de l'efficacité alimentaire chez le bar, en particulier le rôle du métabolisme énergétique. Améliorer l'efficacité alimentaire est un point clé de la durabilité des systèmes aquacoles, car cela permettrait simultanément de réduire les coûts de

production, l'impact environnemental de l'aquaculture et la compétition pour les matières premières entre alimentation des animaux et alimentation humaine. Ce projet s'inscrit en complément d'un projet plus large qui a mesuré l'efficacité alimentaire individuelle de 300 poissons. Dans le présent projet, des mesures de métabolisme énergétique seront effectuées sur 100 individus issus de cette population de 300, en utilisant des méthodes de respirométrie in-vivo. L'effectif de poissons utilisés (100) serait un compromis entre le besoin d'assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés, et les contraintes techniques de mesure de la physiologie in-vivo sur un grand nombre d'individus (Réduction). La méthodologie consiste à placer les sujets dans des chambres métaboliques individuelles pour 48h, et de mesurer leurs échanges gazeux avec l'eau, notamment leur consommation d'oxygène et leur excrétion d'ammoniac. Les chambres métaboliques sont dimensionnées pour permettre une mesure fiable des échanges gazeux mais pour consentir aussi une liberté de mouvement aux individus qui y sont confinés. Les chambres sont rangées dans une pièce calme à éclairage faible, protégée de toute perturbation visuelle et sonore, pour minimiser la probabilité de souffrance et d'anxiété (Raffinement). Cette évaluation phénotypique des mécanismes à la base de l'efficacité alimentaire sera ensuite mise en relation avec une exploration, par séquençage nouvelle génération, de marqueurs génétiques, qui permettra nous l'espérons à terme de remplacer au moins en partie l'évaluation phénotypique des animaux (Remplacement).

4658. Très peu de données anatomiques existent au cours de la croissance chez le poulet. Notre objectif est de mener une étude de développement des organes, tissus et os sur l'espèce *Gallus gallus domesticus*, à l'aide des outils d'imagerie IRM et scanner. Pour cela nous utiliserons 20 mâles et 20 femelles que nous suivrons tous les deux mois de l'éclosion à l'âge adulte (30 semaines). A la suite du passage au scanner et IRM, des pesées régulières et des dosages sanguins seront réalisées afin de relier les données d'imagerie à des données métaboliques.

L'utilisation des animaux lors de nos expérimentations s'effectuera dans le respect de la règle des 3R :

-Remplacer : L'identification d'indicateurs qui relie composition corporelle et fertilité chez la poule ne peut s'effectuer qu'in vivo sur des animaux élevés et abattus en conditions usuelles de production. Les poules sont des animaux domestiques produits et élevés classiquement pour la production de viande ou d'œufs et qui sont aussi régulièrement utilisées pour des expérimentations à visée agronomique.

-Réduire : des expériences préliminaires ont été effectuées pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce protocole.

-Raffiner : Toute intervention sur les animaux sera réalisée par un personnel compétent. Les animaux seront surveillés tous les jours y compris les week-ends. Le comportement, la prise alimentaire, et la croissance des animaux sont des indicateurs de leur état de santé. Les poules et les coqs seront séparés et élevés au sol dans des conditions comparables à celles d'élevages classiques.

4659. Les cellules NKT sont une sous-population de cellules T existant chez l'homme et la souris. Elles ont un mode de reconnaissance distinct des cellules T conventionnelles, reconnaissent des glycolipides présentés par les molécules de classe I non classique CD1d et ont été impliquées dans plusieurs pathologies chez l'homme comme chez la souris.

Nous nous proposons dans ce projet de définir le phénotype, l'origine, la fonction et la localisation tissulaire des sous-populations de cellules NKT chez la souris. L'étude de ces cellules en condition physiologique se fera grâce à l'utilisation de souris génétiquement modifiées qui permettra leur visualisation. Nous étudierons le rôle des cytokines dans leur développement et fonction, avec un intérêt particulier pour certaines cytokines importantes dans le développement des cellules T conventionnelles. L'implication de ces populations lors de réponses immunes/inflammatoires sera également étudiée.

En conclusion, la réalisation de ce projet apportera des informations nouvelles concernant les aspects fondamentaux du développement et de la fonction des sous-populations de cellules NKT.

Cette étude a été conçue en tenant compte de la règle des 3R. Nous réalisons le maximum d'expériences in vitro. Cependant, nous ne pouvons pas nous affranchir d'expériences in vivo afin d'étudier le développement de cette population cellulaire dans l'environnement complexe d'un organisme. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de ces modèles, la multiplicité des paramètres mesurés, l'utilisation des méthodes statistiques nous permettra une exploitation maximale des données obtenues par expérience afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser (1900 animaux pour les 5 ans que durera ce projet). Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux. Une surveillance journalière sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. 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 euthanasiées selon la méthode réglementaire. Les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction.

4660. 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 étudier les effets immunomodulateurs d'un anticorps ciblant la cellule tumorale et mettre en évidence la contribution de ces effets immunomodulateurs dans les effets protecteurs observés.

Nous avons mis en évidence récemment le rôle protecteur d'un anticorps ciblant la tumeur dans un modèle de mélanome chez la souris. En effet un traitement de courte durée est capable de prolonger la survie des souris sur le long terme. L'objectif est désormais d'étudier le rôle du système immunitaire endogène dans les effets protecteurs observés. L'étude a été réalisée sur les souris C57Bl/6 dont le système immunitaire est totalement compétent.

L'objet de cette demande consiste à évaluer désormais les effets protecteurs de l'anticorps monoclonal «AcM» dans un modèle de souris dont le système immunitaire est déficient à différents niveaux afin de mettre en évidence quelles seraient les cellules immunitaires de l'hôte impliquées dans les effets immunomodulateurs de l'anticorps. Nous souhaitons ainsi étudier les effets protecteurs de l'anticorps thérapeutique chez des souris possédant 3 niveaux différents d'immunocompétence: i) des souris sans thymus (Nude) qui sont principalement déficientes en lymphocytes T mais qui possèdent les autres cellules du système immunitaire ii) les souris Scid qui représentent une forme plus sévère d'immunodéfiance avec une absence des lymphocytes B et T et iii) les souris NOD/Scid qui représentent le niveau le plus élevé d'immunodéfiance avec en plus des cellules «Natural Killer» non fonctionnelles.

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 reproduites 1 fois, afin de tester la reproductibilité.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre maximal de 352 souris sur une durée de 1 an. Dans le souci de respecter la règle de 3R, si 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.

Le projet proposé est une étape clé dans la mise en évidence de la réponse immunitaire de l'hôte suite à une immunothérapie à base d'anticorps.

4661. Le squelette, chez l'homme, assure un maintien bipède, une locomotion optimale ou une activité cardiaque et pulmonaire adéquates. Sa croissance chez l'enfant ainsi que sa bonne minéralisation est sous la dépendance de l'activité de différentes cellules et facteurs de croissance. Ils vont permettre l'obtention de la forme définitive des os à l'âge adulte. De plus au cours de cette croissance une bonne acquisition de masse osseuse (AMO) minéralisée est essentielle pour éviter l'ostéoporose et les fractures plus tard dans la vie. Nos travaux portent sur l'étude de ces mécanismes biologiques pendant l'enfance et la puberté : anomalies de taille, scoliose, ostéoporose, rachitisme, fragilité osseuse... Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement médicamenteux spécifiques pour la plupart des malformations osseuses et les mécanismes impliqués au niveau biologique sont très mal connus de plus les traitements orthopédiques ou chirurgicaux proposés sont lourds.

Le but de ce projet est donc d'étudier les mécanismes du développement osseux chez l'enfant et au cours de la puberté en utilisant des modèles de souris génétiquement modifiés qui possèdent des voies biologiques identiques à l'homme. Il se base sur des résultats *in vitro* et *in vivo* préliminaires et publiés qui montrent que les voies de signalisation biologiques que nous étudions jouent un rôle important dans la croissance du squelette et l'AMO associée. Ces recherches nous permettront de proposer le développement d'approches thérapeutiques inexistantes ou innovantes dans la croissance, les malformations ou la fragilité osseuses ainsi que dans la prévention de l'ostéoporose. Le modèle murin que nous utiliserons est adéquat pour notre étude en raison de ses caractéristiques phénotypiques (croissance, taille, poids...) et biologiques (voies des facteurs de croissance, système immunitaire et hormonaux identiques à l'homme) et des nombreux outils d'analyse disponibles.

Ce projet s'inscrit dans la logique et le respect de la règle des « 3R ». Ces animaux seront tout d'abord explorés, au cours de la croissance, au niveau osseux en conditions basales après invalidation des voies d'intérêt. En fonction des résultats obtenus nous explorerons l'interaction avec 2 autres voies majeures de la formation osseuse identiques à celles retrouvées chez l'homme. Pour chaque voie étudiée, nous utiliserons 1 agent pharmacologique déjà prescrit en thérapeutique humaine depuis une dizaine d'années sans toxicité majeure. Nos précédents projets scientifiques sur modèles murins nous ont permis d'évaluer le nombre adéquat d'animaux à inclure dans chaque lot pour obtenir des résultats statistiquement significatifs en utilisant le minimum d'animaux. Ainsi 1080 souris seront utilisées pour l'ensemble des expériences. Notre expertise technique nous permet de quantifier de multiples paramètres à partir d'un animal. De plus une collaboration avec une équipe de recherche permettra l'utilisation des mâchoires des animaux euthanasiés pour l'étude du développement dentaire.

Nous mettrons en place des mesures spécifiques pour diminuer le stress ou la souffrance chez les animaux. De plus, une attention particulière sera apportée à l'état général des animaux (tremblement, posture, pelage...). Enfin, pour éviter les souffrances trop importantes des points limites précoces sont définis et les animaux qui dépasseront un de ces points seront euthanasiés.

4662. La prématurité est un facteur de risque majeur de handicaps moteurs, cognitifs et comportementaux acquis en période périnatale. Le risque de développer des pathologies psychiatriques augmente également en fonction du niveau de prématurité. Des lésions cérébrales sont fréquentes, souvent associées à des épisodes hypoxo-ischémique, inflammatoires, hémorragiques en particulier, mais il n'existe pas de corrélation stricte entre ces atteintes détectées par l'imagerie cérébrale et la gravité des séquelles observées à différentes étapes du développement de l'enfant (marche, parole, lecture...). Les moyens d'assurer une neuroprotection chez l'enfant prématuré sont peu nombreux (hypothermie, corticoïdes, mélatonine, sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>)), et demandent toujours des études visant à la fois à cerner leurs modes d'action et à vérifier l'absence d'effets secondaires indésirables, en particulier à long terme. En effet la prise en charge de ces enfants relève d'une médecine d'urgence, dont la validation des procédures est essentiellement basée sur une efficacité immédiate, mais l'incidence toujours croissante des naissances prématurées et les évidences démontrées de très fréquents effets à long terme demandent des études complémentaires de non-toxicité des procédures utilisées.

Le principal objectif du projet est de vérifier l'absence d'effets secondaires indésirables, en particulier à long terme, du sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>), un agent protecteur utilisé en clinique néonatale. Un des modes d'action du MgSO<sub>4</sub> passe par l'antagonisme des récepteurs NMDA. Certains bloqueurs des récepteurs NMDA comme le MK-801 ou encore la kétamine utilisée en anesthésie pédiatrique produisent chez l'animal des effets délétères à long terme, nous comparerons les effets du MgSO<sub>4</sub> avec ceux obtenus

pour le MK-801 et la kétamine. Pour cela, les substances seront administrées en période post-natale précoce (à 5 jours : une injection unique ou pendant 5 jours) et nous étudierons leur impact sur les processus attentionnels impliqués dans l'alerte chez le jeune (avant la puberté) et à l'âge adulte. Cette approche comportementale n'est possible qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peut être reproduite *in vitro* ni *ex vivo*.

Pour ces expériences 210 souris seront utilisées. Un tel effectif est nécessaire afin de disposer d'effectifs suffisants pour permettre des comparaisons statistiques cohérentes dans chacune des procédures expérimentales utilisées. Finalement, nos expériences ont été conçues de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser. Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur.

4663. Pour contrôler la survie des neurones, le système nerveux central a besoin d'un microenvironnement spécifique dont le maintien dépend de cellules immunitaires, les microglies. Ces cellules initient les mécanismes de protection immunitaire en conditions physiologiques et pathologiques, de façon à nettoyer le cerveau des produits métaboliques et débris cellulaires résiduels. Quand l'activité microgliale ne peut rattraper les demandes, l'homéostasie et l'environnement "propre" ne peuvent être maintenus. Les fonctions neuronales en seront altérées de différentes façons. En conditions physiologiques, la production de débris dans l'environnement local provient largement des neurones actifs, spécifiquement au niveau synaptique (encore appelés "débris synaptiques"). La plasticité synaptique ou neuronale représente un pan essentiel de la neurophysiologie, car elle joue un rôle clé dans les processus d'apprentissage et de formation et consolidation de la mémoire, dans les circuits neuronaux impliquant par exemple l'hippocampe et les régions associées. La plasticité neuronale joue également un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones de l'hypothalamus.

Notre hypothèse de travail est que l'activité microgliale est essentielle pour nettoyer au bon moment les débris formés par l'activité neuronale, et que ces mécanismes sont essentiels pour permettre une consolidation de la mémoire à long terme dans l'hippocampe et les régions associées.

A l'aide de deux modèles transgéniques, l'un ou l'horloge biologique intrinsèque de la microglie est altérée (KO du gène de l'horloge *Bmal1*), et l'autre où le métabolisme de la microglie est altéré (KO du gène de la lipoprotéine lipase, *LPL*), nous étudierons comment le dysfonctionnement de la microglie affecte la plasticité synaptique de l'hippocampe dans les mécanismes d'apprentissage, de formation et de consolidation de la mémoire.

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 (144), a été réduit au minimum pour permettre des analyses statistiques fiables sur les souris car il existe une dispersion des performances de mémoire et des signalisations moléculaires chez les animaux pathologiques. Raffinement: afin de minimiser l'angoisse, la douleur et la souffrance, les animaux sont manipulés 2 min/jour, durant la semaine précédant le début du test comportemental. 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 (réduction).

4664. - Contexte : Les pathologies métaboliques (obésité, diabète de type 2, stéatose hépatique ou maladie du « foie gras » et leurs complications vasculaires (athérosclérose) sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés et sont en augmentation constante dans les pays en voie de développement. Ils représentent donc un enjeu majeur de santé publique et la compréhension fine des mécanismes cellulaires et moléculaires qui ont lieu au sein de l'organisme est indispensable pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques puis mettre au point de nouveaux médicaments.

Alors qu'il a très longtemps été considéré que ces maladies étaient seulement dues à des dérèglements du métabolisme des glucides (« sucres ») et des lipides (« graisses »), il est aujourd'hui admis que les cellules du système immunitaire (qui circulent dans le sang) sont présentes dans pratiquement tous les organes du corps, en particulier dans certains tissus spécialisés comme la rate et les ganglions) et l'inflammation jouent un rôle très important dans le déclenchement et la persistance de ces maladies.

De manière assez inattendue – mais logique à l'aune de ces découvertes récentes-, parmi les facteurs aggravant les pathologies, on trouve des maladies associées au système immunitaire comme l'asthme allergique, affectant principalement les poumons, et des maladies fréquentes de la peau comme la dermatite atopique et le psoriasis.

Aussi, comme, les cellules immunes sont donc des acteurs centraux à la fois des pathologies métaboliques et des pathologies inflammatoires de la peau et des poumons, élucider leur rôle précis dans ces deux groupes de pathologies et dans leurs interactions pourrait permettre, à terme, de traiter l'un et l'autre type d'affections.

But: Ce projet vise donc à étudier la contribution des cellules immunes dans les deux types de pathologies et dans l'aggravation de l'une par l'autre. Il s'agira notamment de déterminer comment certains facteurs régulent le développement et la fonction des cellules immunes dans le contexte de ces maladies. Ces facteurs sont d'une part certains récepteurs nucléaires (il s'agit de récepteurs à des dérivés de lipides qui, lorsqu'ils fixent ceux-ci, interagissent avec l'ADN dans le noyau de chaque cellule pour réguler leur fonction) et certains récepteurs membranaires (présents à la surface des cellules et sensibles aux molécules qui circulent dans les fluides corporels que sont le sang et la lymphe ou sont situées à la surface des cellules voisines.).

- Recours à l'expérimentation animale : Les pathologies métaboliques et/ou immunes impliquent de nombreux organes du corps et de nombreux types cellulaires circulant entre ces organes. Comme il est impossible de reproduire la complexité de ces

interactions in vitro, l'expérimentation animale in vivo est indispensable pour reproduire de manière aussi réaliste que possible ces pathologies. En raison du grand nombre de lignées génétiquement modifiées disponibles et de la facilité relative avec laquelle il est possible d'en créer de nouvelles, la souris a été choisie comme modèle d'étude. Un nombre maximal de 25680 animaux sera utilisé pour ce projet.

- Respect de la législation (Règle des 3 R). Le nombre d'animaux qui sera utilisé au cours de ce projet a été réduit au minimum en agissant à plusieurs niveaux.

Remplacement : S'il est impossible de remplacer l'expérimentation in vivo pour étudier les pathologies dans toute leur complexité, certains mécanismes cellulaires et moléculaires seront étudiés in vitro.

Réduction : L'utilisation de conditions les plus standardisées possibles (conditions d'hébergement, âge et sexe des animaux, groupes contrôles appariés, horaires de réalisation des expériences...) et l'entraînement et la dextérité du personnel impliqué dans l'expérimentation permettent de diminuer la variabilité individuelle des réponses des animaux et par voie de conséquence le nombre d'animaux nécessaires par groupe pour obtenir des résultats significatifs. De plus, un maximum d'organes est prélevé sur chaque animal afin d'obtenir un maximum de paramètres pour chaque expérience et ainsi éviter la répétition d'expériences pour l'obtention d'organes non initialement ciblés.

Raffinement : L'hébergement dans des conditions sanitaires optimales (exemptes d'organismes -opportunistes et- pathogènes spécifiques), l'enrichissement de l'environnement dans les cages (abris et « jeux »), le maintien des interactions sociales, l'utilisation de techniques non invasives, des produits anesthésiques et analgésiques optimaux, et la dextérité du personnel contribuent à réduire le stress durant toute la vie des animaux y compris durant l'expérimentation. Une surveillance quotidienne est également pratiquée.

4665. De nouveaux systèmes performants d'imagerie optique ont été récemment développés grâce aux dernières avancées dans le domaine des technologies associées à l'optique (caméra CCD, lasers...). Ces systèmes, simples d'utilisation et de faible coût, pourraient supplanter et/ou être complémentaires des autres systèmes d'imagerie existants (scanner, IRM, échographie...). En particulier, l'imagerie in vivo de fluorescence se révèle être une méthode intéressante car le système d'imagerie peut être portable et tenir dans la main du chirurgien pour mieux assister son geste lors de ses opérations. En outre, cette méthode d'imagerie est particulièrement adaptée pour imager des tissus au travers quelques cm. Néanmoins, elle nécessite l'injection d'un agent de contraste capable d'émettre de la fluorescence (fluorophore).

Notre laboratoire développe de nouveaux vecteurs nanoparticulaires pour l'utilisation de fluorophores. Ces nanotraceurs (agent de contraste) sont compatibles avec une utilisation dans un organisme vivant (biocompatibles). Ils transportent le fluorophore tout en le protégeant de la dégradation. De plus, leur taille (<100 nm) favorise leur circulation dans des réseaux constitués de fins vaisseaux, notamment le réseau lymphatique, tout en augmentant le temps de circulation dans l'organisme en échappant aux défenses immunitaires.

Les objectifs de cette étude in vivo après administration du nanotraceur sont la détection des ganglions lymphatiques par imagerie dans le but d'assister le geste chirurgical au cours de la biopsie du ganglion sentinelle (ganglion drainant le foyer tumoral) et l'évaluation de la biodistribution du nanotraceur dans l'organisme. Nos travaux permettront de comparer les caractéristiques physico-chimiques de nos traceurs avec ceux existants sur le marché et de valider l'efficacité de marquage (par des ligands de ciblage).

Pour remplir ces objectifs, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique car l'étude des éléments permettant de suivre la distribution des traceurs d'imagerie optique dans un réseau lymphatique ne peut se faire que dans un corps entier.

C'est pourquoi 108 rongeurs, seront utilisés à raison de 3 par formulation de nanotraceur, les animaux étant nés et élevés dans un établissement agréé à des fins scientifiques.

Ces études conduites sous anesthésie, consistent en une injection de nanotraceur et un examen par imagerie, technique non invasive pour l'animal. Les études sont menées sur un même animal au cours du temps, ce qui permet de vérifier la biodistribution des nanotraceurs dans un même organisme. Ainsi, les suivis longitudinaux sur les animaux permettent de limiter au minimum nécessaire leur nombre.

Leur hébergement en groupe sociaux est privilégié tout au long de l'expérience. Ils seront surveillés quotidiennement et dès l'apparition de signes de douleur ou lors de l'atteinte d'un critère d'interruption anticipé, défini préalablement, l'expérimentation sera arrêtée.

4666. Les études réglementaires de l'activité de lot de vaccins inactivés de la Fièvre Aphteuse pour bovins 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 la pharmacopée européenne.

Les études réglementaires de l'activité de lot de vaccins inactivés de la Fièvre Aphteuse menées sur bovins consistent à administrer aux animaux une dose de vaccins inactivés de la Fièvre Aphteuse selon la voie d'administration recommandée puis de réaliser ensuite un suivi sérologique afin de s'assurer de la présence d'anticorps après vaccination. Suite à la vaccination, les animaux pourront présenter de légères réactions locales au site d'injection et une augmentation de la température corporelle. Au cours de ces études, au moins deux prélèvements sanguins seront réalisés sur les bovins afin de suivre la prise vaccinale. A l'issue de ces essais, les animaux seront mis à mort afin de respecter le principe de précaution conformément à la législation européenne.

Conformément à la pharmacopée européenne, l'activité de lot de vaccins inactivés de la Fièvre Aphteuse doit être démontrée in vivo. Ainsi, selon la pharmacopée européenne, au minimum 5 animaux par groupe doivent être vaccinés. Le nombre de groupe

dépendra du nombre de voie d'administration recommandée et du nombre de lots à tester. A noter, un maximum de 750 bovins sera vacciné sur 5 ans.

Afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation sera dispensée avant vaccination.

Tout au long de leur hébergement sur le site, les bovins auront des conditions d'hébergement adaptées. Ainsi, ils 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.

Afin d'augmenter leur bien-être, les animaux seront hébergés collectivement.

De plus, ils auront au minimum l'un des enrichissements suivants:

\* litière de paille apportant aux animaux une autre source de fibres et augmentant le confort au moment du repos.

\* brosse à vache permettant d'augmenter le bien-être et l'état sanitaire des animaux. Elle stimule la circulation sanguine, nettoie et diminue le risque de blessures ou de démangeaisons.

\* objets à manipuler (chaîne pouvant être associée à une balle plastique, ballon) permettant à l'animal de jouer.

Afin de maintenir des conditions optimales d'hébergement, les paramètres d'ambiance, l'aliment, l'abreuvement sont vérifiés quotidiennement.

Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

4667. Les composés per- et polyfluorés (PFAS) sont employés dans de très nombreuses applications d'usage courant (traitements anti-tâche, imperméabilisation de cuirs ou de textiles, revêtements anti-adhésifs, mousses extinctrices ...) ou dans l'industrie (fabrication de polymères) qui exploitent leurs caractéristiques physico-chimiques exceptionnelles. Le corollaire de ces usages multiples est une exposition généralisée des milieux, notamment aquatiques. Les mêmes propriétés physico-chimiques induisent un devenir dans l'environnement échappant aux outils prédictifs courants, alors qu'il est largement reconnu que certains de ces composés sont persistants et bioaccumulables. Cependant, les études mécanistiques sont encore rares, en particulier chez les vertébrés aquatiques, tandis que les PFAS utilisés par l'industrie évoluent rapidement. Il paraît donc urgent d'améliorer les connaissances liées à cette problématique.

Le projet se développera autour de l'acquisition de données expérimentales sur la bioaccumulation et la distribution dans les organes (foie, cerveau, rein, muscles, etc.) de trois composés perfluorés modèles chez une espèce de poisson (truite arc en ciel – *Oncorhynchus mykiss*), à partir d'aliments contaminés et se fera en deux temps, une fois en hiver et une fois en été, tenant ainsi compte de l'influence bien connue de la température sur la physiologie des espèces aquatiques.

Ces données expérimentales serviront à développer un modèle toxicocinétique à base physiologique, adapté à partir de modèles existants. Cette démarche impose donc d'euthanasier les truites puisque les analyses sont pratiquées sur différents tissus (la substitution du modèle animal, requise selon la règle des 3R, est ici non applicable). Chaque expérimentation visée impliquera 70 truites portant ainsi à 140 le nombre total de poissons impliqués ; ce nombre a été ajusté en vertu de la règle pour la réduction du nombre d'animaux utilisés, pour assurer la robustesse statistique des cinétiques obtenues. La contamination des truites se fera via la nourriture, à des concentrations réputées non toxiques ; la surveillance quotidienne des bassins permettra d'assurer un déroulement de l'expérimentation en minimisant la souffrance des truites, respectant ainsi la troisième règle, le raffinement.

4668. 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 2011, l'insuffisance cardiaque a causé 69972 décès et le nombre d'hospitalisations s'est élevé à 165231 en 2013 en France.

L'insuffisance cardiaque est liée à un affaiblissement du cœur qui n'est plus capable d'assurer l'apport en sang dans l'organisme. C'est une maladie symptomatique qui se manifeste par une intolérance à l'effort, une apathie, des difficultés respiratoires (dyspnée) et des œdèmes. Cette pathologie est souvent accompagnée de facteurs de risque, tels que l'hypercholestérolémie, l'hypertension, le diabète ou l'obésité.

A ce jour, le développement de stratégies thérapeutiques efficaces pour l'insuffisance cardiaque reste encore limité par le manque de modèles expérimentaux appropriés. Il s'agit de plus d'un processus intégré et complexe qui n'est à l'heure actuelle pas modélisable in vitro. Les mesures des paramètres physiologiques, telles que la fonction cardiaque, la pression artérielle, la fréquence cardiaque et les altérations de l'électrocardiogramme sont réalisables uniquement chez l'animal vivant.

Chez le rongeur, il existe des souches présentant ces facteurs de risque mais dont la connaissance nécessite encore d'être approfondie ou élargie dans le domaine de l'insuffisance cardiaque. Dans leur grande majorité, les connaissances de ces modèles expérimentaux se limitent par exemple uniquement aux mâles, et ne prennent donc pas en considération l'effet sexe.

L'objectif de ce projet est d'évaluer le potentiel de différentes souches et/ou sexes de rats, présentant des facteurs de risques, à devenir de nouveaux modèles animaux prédictifs pour la découverte et la sélection de candidats médicaments dans l'insuffisance cardiaque.

Pour cela différentes évaluations vont pouvoir être réalisées :

Les fonctions cardiaque et vasculaire seront évaluées par des échographies et laser doppler réguliers. Ces mesures non invasives et indolores sont réalisées sous anesthésie afin de limiter le stress pour l'animal et peuvent être réutilisées au cours du temps sur un même animal, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux par étude, et sous anesthésie gazeuse, le temps de la mesure.

Les facteurs de risques tels que l'hypertension, pourront quant à eux être caractérisés par des mesures de pression artérielle, de fréquence cardiaque et électrocardiogramme par télémetrie, une méthode de référence qui permet des mesures à distance, fiables et



reproductibles, en temps réel, sur une période pouvant aller jusqu'à 6 mois au sein de l'animalerie et enfin sans contrainte pour l'animal maintenu dans son environnement habituel. Cette technique implique la mise en place d'un implant sous anesthésie générale gazeuse complétée d'une analgésie. L'état général des rats sera surveillé en post-opératoire afin de s'assurer qu'ils ont bien récupéré leur état de santé normal (sutures, masse corporelle, activité locomotrice...).

La télémetrie pourra également permettre d'étudier plus finement les symptômes de l'insuffisance cardiaque tels que l'intolérance à l'effort dans le cadre d'évaluations de la capacité d'adaptation à l'exercice (course sur tapis roulant avec enregistrement simultané des paramètres hémodynamiques par télémetrie), ou encore les phases de décompensation caractéristiques de l'insuffisance cardiaque chronique, dans le cadre de « challenge sodé » (administration par voie orale d'une solution saturée en sel pour induire une hypervolémie transitoire).

Pour permettre les mesures de télémetrie, il est nécessaire de placer les rats en cages individuelles. Une diversité sera apportée à leur environnement par des bâtons de bois à ronger afin de réduire le stress occasionné par l'hébergement individuel.

Tout au long de l'évaluation des souches pathologiques, l'installation de l'insuffisance cardiaque et l'éventuelle survenue de symptômes caractéristiques seront particulièrement surveillés. En cas d'observation de ces signes cliniques, les rats recevront un traitement adapté selon les guides de prise en charge de l'insuffisance cardiaque utilisés en médecine vétérinaire et humaine. En cas d'inefficacité du traitement ou de toute autre survenue d'un signe clinique listé parmi les points limites prédéfinis l'animal sera retiré de l'étude.

En fin d'expérimentation, une caractérisation plus complète des fonctions cardiaques et vasculaires est effectuée sur animal anesthésié et sans réveil consécutif. L'anesthésie permet de travailler dans un environnement contrôlé qui réduit la variabilité des mesures. Cette procédure peut être réalisée à la suite des techniques d'échographie, de laser doppler et de télémetrie, réduisant ainsi le nombre d'animaux. Après cette étape des analyses sur les organes et tissus recueillis (biochimiques, histologiques, biologie moléculaire,...) permettront de compléter la caractérisation du modèle.

Ce projet va nécessiter jusqu'à 1200 rats sur toute sa durée de 5 ans, permettant en moyenne la caractérisation de 1 à 2 souches par an.

4469 Les anticorps (Ac), polyclonaux et monoclonaux, sont des outils incontournables en biologie. Ils sont obtenus en immunisant un mammifère contre l'antigène à étudier. En 1975, Köhler et Milstein produisent les premiers Ac monoclonaux en utilisant une méthode qui est devenue rapidement l'une des technologies clés de l'immunologie. En fusionnant des lymphocytes B activés avec des cellules de myélome, ils ont été capables de former des cellules hybrides - appelées hybridomes - qui conservent les propriétés sécrétrices d'anticorps des cellules B activées et celles d'immortalité des cellules de myélome. Sélectionnés et clonés, ces hybridomes constituent une source théoriquement illimitée d'Ac spécifiques, tous identiques.

La production des Ac monoclonaux se déroule en deux étapes principales, à savoir, la production in vivo (immunisation d'une souris) de cellules sécrétant des anticorps, leur hybridation et la sélection in vitro d'un hybridome producteur d'anticorps, puis la multiplication de clones de l'hybridome, soit in vitro, soit in vivo par production d'ascite, afin d'obtenir de grandes quantités d'Ac. Les Ac monoclonaux sont devenus des outils révolutionnaires largement exploités dans de nombreuses applications au niveau de la recherche fondamentale et du diagnostic in vitro. Les Ac monoclonaux sont utilisés comme réactifs dans les immunodosages, remplaçant souvent les antisérums traditionnels. Dès leur découverte en 1975, les Ac monoclonaux produits par la technique des hybridomes sont utilisés en thérapeutique et désignés par un nom se terminant par le suffixe «-momab». Cependant, ces Ac étant d'origine murine, les patients traités par ces médicaments produisaient des Ac anti-souris. De plus, ces Ac de première génération avaient une demi-vie très courte après injection et n'étaient pas capables d'exercer certaines fonctions effectrices. De nombreuses années de développement et d'innovation ont été nécessaires pour humaniser les Ac monoclonaux, afin de les rendre utilisables en thérapeutique humaine. Cela a conduit, en 1984, à la production d'une nouvelle génération d'Ac, les Ac chimériques, désignés par le suffixe «-ximab» (exemple de spécialité mise sur le marché : Erbitux®, cétuximab). Dans ce cas, les domaines constants de l'anticorps murin sont substitués par les domaines constants humains équivalents. Une troisième génération d'Ac monoclonaux est constituée d'immunoglobulines humaines dont seules les parties hypervariables sont d'origine murine ce qui diminue encore le caractère immunogène. Ce sont des Ac dits humanisés, et désignés par le suffixe «-zumab» (exemple: Avastin®, bévacizumab).

Nous avons besoin de recourir à l'animal pour développer de nouveaux Ac mono- ou polyclonaux en fonction de la demande. Actuellement, aucune méthode ou technique ne permet de développer des Ac in vitro.

Remplacement : la production des Ac monoclonaux à partir des hybridomes sélectionnés et stabilisés sera réalisée en premier dans des bioréacteurs. En cas d'échec, nous aurons recours à la production des Ac par ascite chez la souris.

Réduction : Le protocole des immunisations est bien établi et confirmé par la communauté scientifique. Le nombre de 3 souris par antigène est un compromis acceptable. Si une seule souris suffit lors de l'hybridation, les autres souris non utilisées seront sacrifiées et leur sérum sera utilisé comme un sérum polyclonal.

Raffinement : l'injection des antigènes n'est pas une source de pathologies douloureuses entraînant une souffrance animale. Les précautions à prendre lors des injections sont l'utilisation de certains adjuvants qui nécessitent une injection préalablement de buprenorphine. Ce projet porte sur 275 souris et 50 rats au maximum.

4670. Les toxines botuliques sont utilisées en clinique dans la prise en charge de la sialorrhée.

La sialorrhée se définit comme une fuite de salive lors de l'ouverture de la bouche. Elle est due à une sécrétion exagérée ou à un trouble de la déglutition. Elle s'observe lors de différentes pathologies neurodégénératives telle que la maladie de Parkinson, la

sclérose latérale amyotrophique, l'infirmité motrice consécutive à une atteinte cérébrale... La sialorrhée cause un inconfort majeur avec des répercussions sociales.

Les traitements de la sialorrhée par voies orale ou transdermique, de même que la prise en charge chirurgicale sont souvent inefficaces ou comportent des effets indésirables importants tels que des hallucinations, des troubles de la mémoire, des troubles de la miction...

Chez l'homme, une administration intra glandulaire de toxines induit une diminution de plus de 50% de l'hypersalivation. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé après plusieurs mois.

Des recherches sont donc effectuées pour améliorer l'efficacité des toxines en termes de puissance, de rapidité et de durée d'action.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets de nouvelles toxines administrées directement dans les glandes salivaires et de comparer leurs effets sur la sécrétion salivaire chez le rat.

Il n'existe pas de modèle in vitro permettant de mesurer la fonctionnalité des glandes salivaires. Cependant, ce projet ne sera réalisé chez l'animal qu'après avoir caractérisé les toxines dans des tests in vitro aussi bien biochimiques que cellulaires.

Toute l'expérimentation sur l'animal se fera sous anesthésie générale.

A ce jour, il n'existe pas de modèle animal présentant une hypersalivation spontanée, celle-ci doit être stimulée. Ainsi ce projet se développe en 2 étapes.

La première étape sera de mettre au point un modèle d'hypersalivation décrit dans la littérature. L'hypersalivation sera induite par un composé utilisé chez l'homme pour traiter la sécheresse buccale et évaluée en mesurant la quantité de salive produite. La salive sera récupérée à l'aide de boules de coton placées dans la cavité buccale des rats. Lors de cette mise au point, un calcul d'effectifs sera réalisé afin d'ajuster le nombre d'animaux par groupe. D'après la littérature 8 à 10 animaux par groupe sont nécessaires.

La deuxième étape du projet sera l'évaluation des effets des toxines sur le modèle d'hypersalivation. Dans un premier temps, les animaux recevront, sous anesthésie générale à l'isoflurane, une injection de toxine dans les glandes salivaires sous maxillaires. Pour cela, une petite incision de la peau du cou sera réalisée afin d'identifier précisément ces glandes et de visualiser le site d'injection. Un anesthésique local possédant des propriétés analgésique sera également appliqué au préalable au niveau de l'incision de la peau. L'ouverture sera ensuite refermée par une agrafe. L'anesthésie à l'isoflurane étant de courte durée, le réveil se fera immédiatement après l'arrêt de l'anesthésie.

La première toxine testée sera une toxine de référence connue.

Dans un deuxième temps l'hypersalivation sera induite telle que définie dans la mise au point. Comme il n'y a pas d'acte chirurgical dans cette procédure mais seulement une contention permettant de placer et de maintenir les boules de coton dans la cavité buccale de l'animal, on utilisera comme anesthésique un hypnotique. Cet agent a l'avantage de préserver toutes les fonctions physiologiques de l'animal pendant l'anesthésie.

L'hypersalivation sera déclenchée sur les mêmes animaux à plusieurs reprises dans le temps afin d'évaluer la puissance, la rapidité et la durée d'action des toxines. Cela permettra également de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Chaque expérience comportera au minimum un groupe contrôle et un ou plusieurs groupes traités avec des doses et/ou des toxines différentes à étudier.

Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. L'évaluation de leur état général se fera à l'aide d'une grille d'évaluation contenant des points limites précis (évolution du poids corporelle, état du pelage, comportement dans la cage...). De la nourriture hydratée sera mise à la disposition des rats afin d'assurer une bonne alimentation en cas de perte de salive très importante. Les animaux sont hébergés en groupe avec enrichissement.

Une estimation de 4000 rats est prévue sur une période de 5 ans.

4671. Le cœur embryonnaire est une structure complexe qui est à l'origine d'une variété de malformations chez les nouveau nés et enfants. Sa formation dépend de l'acide rétinoïque (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> (mutation sur les deux allèles) 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 nataux (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 thermorégulée 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 euthanasie selon la réglementation.

4672. Plus de 5000 greffes d'organes sont réalisées en France chaque année (5357 greffes en 2013). La transplantation d'organes est le seul traitement de certaines pathologies et augmente de plusieurs années la durée de vie des patients. Dans d'autres pathologies, comme l'insuffisance rénale terminale, la transplantation augmente considérablement la qualité de vie des patients (reprise d'une activité professionnelle ou des études, possibilité d'avoir des enfants). Cependant, la survie des organes greffés est compromise à long terme par l'activation du système immunitaire du receveur. Le système immunitaire du patient reconnaît l'organe greffé comme étranger et lutte contre celui-ci par l'élimination des cellules étrangères. Suite à une greffe, la prévention du rejet est menée par des immunosuppresseurs dont l'action vise à inhiber le système immunitaire.

Les lymphocytes T CD4 sont les cellules du système immunitaire qui coordonnent l'activation des cellules responsable du rejet, les lymphocytes T CD8 et les lymphocytes B. Depuis une trentaine d'années les biothérapies ont permis le développement d'une molécule ciblant plus spécifiquement des lymphocytes T que les immunosuppresseurs traditionnels et induisant moins d'effets indésirables, le CTLA4-Ig. Cependant ce traitement n'est pas capable de prévenir certains rejets aigus. Notre équipe a précédemment décrit une corrélation entre les rejets sous CTLA4-Ig et la présence de lymphocytes T CD4 particuliers. Ces cellules sont capables de s'activer de manière non conventionnelle.

Nous souhaitons dans cette étude démontrer le rôle de cette population de lymphocytes T CD4 dans le rejet de greffe. Pour respecter la règle des 3R, nous avons jusqu'alors remplacé ce modèle animal par des expériences in vitro. Nos précédents résultats nécessitent toutefois une validation in vivo puisque nos expériences ne reflètent que partiellement le rejet de greffe. En effet ces expériences ne peuvent reproduire ni la dose de CTLA4-Ig présente dans l'organe rejeté ni l'ensemble de la réponse immunitaire à long terme.

Nous nous proposons de mettre en place un modèle de rejet de peau humaine par des cellules immunitaires elles aussi humaines et portées par des souris génétiquement modifiées pour l'acceptation de ces cellules. Nous évaluerons le temps de rejet de la greffe suite à l'injection cellules immunitaires + ou - notre population d'intérêt. Puis nous analyserons la présence des cellules immunitaire au sein des greffes de peau. Dans les mêmes conditions nous évaluerons l'effet du traitement CTLA4-Ig.

Nous nous sommes attachés à réduire le nombre d'animaux dans cette expérimentation. L'obtention d'un nombre suffisant de données pour une analyse statistique nécessitera la greffe de 54 souris. Ce nombre a été calculé à partir de données antérieures publiées par des revues scientifiques et selon une méthode de calcul de la taille d'un échantillon.

Le choix d'une lignée de souris humanisées nous permet de raffiner cette expérimentation. Les souris seront maintenues dans un environnement enrichi tout au long de leur vie et au cours de l'expérimentation un protocole d'analgésie a été déterminé en cas de douleur. Les greffes de peau et les injections de PBMC seront réalisées sous anesthésie suivie d'une analgésie. De plus un suivi journalier de la douleur des animaux sera réalisé, par la suite les effets délétères du rejet de peau seront contrôlés par des antidouleurs.

4673. Les traumatismes cérébraux sont la première cause de consultation dans un service d'urgence et la troisième cause de décès dans le monde. Les patients souffrant de ces traumatismes présentent un risque augmenté de problèmes cognitifs et comportementaux ainsi que d'épilepsie post traumatique. Cette épilepsie post-traumatique ou EPT, pharmaco-résistante le plus souvent, est une conséquence à long terme pour laquelle peu de thérapies sont proposées. Le but du présent projet et de disséquer les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de l'apparition de ces conséquences délétères afin de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Les modèles de traumatisme par impacts corticaux contrôlés sont les plus utilisés en recherche fondamentale, car ils miment de façon très pertinente les accidents cérébraux pénétrants responsables des épilepsies induites. Ce modèle développé par Lighthall en 1988 permet de satisfaire aux conditions de standardisation et de reproductibilité.

L'évolution post trauma se découpe en 2 phases, une phase dite de latence, asymptomatique pendant laquelle il n'est pas observé de modification du comportement puis une phase chronique pendant laquelle toutes les modifications comportementales, cognitives et mnésiques se développent.

L'équipe s'intéresse aux phénomènes cellulaires associés aux dommages, à l'inflammation et aux réorganisations des réseaux neuronaux. Le but du projet est de comprendre quel est l'enchaînement d'événements qui conduit un cerveau sain à devenir pathologique et pourquoi cela se fait en 2 phases.

Enfin nous testerons un composé pharmaceutique sur le modèle et sa potentialité d'action sera évaluée.

Le nombre de souris utilisé pour le projet sera de 828 animaux sur 5 ans, répartis en plusieurs groupes, afin de tester la pertinence thérapeutique de notre composé d'intérêt. Une attention particulière sera apportée à la gestion de la douleur des animaux au travers de procédures pré- et post-opératoires et la rédaction de grilles de suivi afin d'évaluer l'état des animaux tout au long de la procédure. De façon particulière la douleur sera gérée à l'aide d'antalgiques puissants administrés de façon préventive et curative.

Le nombre est calculé afin de respecter les règles de réduction et est en accord avec la règle des 3R, de plus ce nombre d'animaux nous permettra d'un point de vue statistique de satisfaire aux pré-requis d'une distribution normale et donc d'être plus stringent dans notre analyse statistique afin d'optimiser les résultats. Les animaux seront hébergés en animalerie conventionnelle avec enrichissement du milieu (ajout de « Tunnel ») et avec un contrôle de la température et de l'hygrométrie.

4674. La stimulation cérébrale profonde (deep brain stimulation, DBS), encore appelée neurostimulation, est une technique qui permet de modifier l'activité des neurones d'un endroit précis du cerveau via une électrode implantée chirurgicalement. Elle est actuellement proposée aux patients atteints de la maladie de Parkinson pour traiter les troubles moteurs invalidants (akinésie, rigidité, tremblement) avec un important succès. Elle est de plus en plus étudiée en vue d'applications cliniques dans d'autres maladies du système nerveux comme les maladies psychiatriques, par exemple les troubles obsessionnels et compulsifs, et plus récemment les troubles de la conscience (état de coma, ou état de conscience minimale qui se traduit par un réveil très faible après un accident cérébral grave).

Cependant, alors que l'effet de la neurostimulation est parfois spectaculaire, deux défis persistent :

1-l'identification de tous les mécanismes n'est pas encore connue : les effets de la DBS vont au-delà de la région ciblée par l'électrode, et il reste à identifier la dynamique cérébrale globale durant la DBS

2-il n'existe pas de modèle informatique global des effets cérébraux de la DBS. Or un tel modèle serait très précieux, car il pourrait prédire les effets de la DBS pour une région cérébrale donnée, offrant ainsi un rationnel avant de tester la neurostimulation dans une nouvelle application clinique.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de mener une étude pour analyser finement les mécanismes de la DBS dans le traitement de la maladie de Parkinson (application déjà validée dans le monde clinique) et ensuite développer des cibles de stimulation pour traiter les troubles de la conscience (application encore en cours de recherche). Partant des données acquises dans des modèles de ces deux maladies (maladie de Parkinson et troubles de la conscience) avec et sans DBS, une modélisation de manière informatique des effets de la stimulation cérébrale sur le cerveau de manière générale sera tentée.

Mais comment pourrait-on réaliser cette recherche ? Les espoirs se tournent vers l'IRM dite fonctionnelle (IRMf), qui consiste à utiliser la machine IRM habituelle pour observer localement les afflux de sang et donc l'activité d'un organe.

Ce travail nécessite le recours à l'expérimentation animale, aucun modèle informatique ou cellulaire mimant la complexité de ces pathologies n'existant à ce jour. Le modèle du primate non humain se justifie par les similitudes génétiques et cérébrales très fortes avec l'humain, permettant une application plus adaptée aux pratiques cliniques. Ce projet implique 12 animaux, tous issus d'un élevage autorisé et dédié à l'expérimentation. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, le suivi au cours du temps des expériences ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

Les animaux seront hébergés dans des conditions appropriées à préserver leur bonne santé et leur bien-être. Leur état de santé sera contrôlé très régulièrement par une équipe formée et soucieuse du bien-être animal tout au long de l'étude, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée à la moindre détection d'un signe de souffrance. Les méthodes expérimentales proposées comportent une définition de critères d'arrêt d'expérimentation en cas de signes de souffrance. De plus, les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par un vétérinaire et seront mis en œuvre par un médecin hospitalier formé à la préclinique. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis continuellement pour veiller à la bonne santé des animaux tout au long des expérimentations.

4675. L'arsenal thérapeutique dont dispose le clinicien pour freiner le développement de la leucémie aiguë myéloïde (LAM) reste, encore à ce jour, limité à l'utilisation de molécules de chimiothérapie qui ne permettent pas malheureusement d'éradiquer cette maladie. Ainsi, environ 60% des patients présentent des leucémies résistantes au traitement conventionnel ou rechutent après la première ligne de traitement. Il apparaît donc crucial d'identifier les aspects moléculaires et fonctionnels impliqués dans la résistance des cellules leucémiques aux chimiothérapies conventionnelles, en utilisant les modèles de transplantation de LAM que nous avons précédemment décrits et qui seront combinés à une approche de criblage à grande échelle afin d'identifier les acteurs moléculaires clés responsables de la chimiorésistance. Au terme de notre projet, les résultats obtenus devraient contribuer à l'amélioration des traitements proposés aux patients. Notre projet s'articule autour de 2 axes :

L'objectif 1 est d'identifier par criblage shRNAs à haut débit les gènes qui participent à la chimiorésistance de quatre modèles transplantables de LAM arborant les altérations géniques FLT3-ITD, MLL-AF9, N-RasG12D, TET2-/- et RARA403 qui sont fréquemment retrouvées dans la pathologie humaine.

L'objectif 2 consiste à développer un modèle préclinique par xénogreffe de cellules de LAM humaines réfractaires aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels dans des souris immuno-déficientes (NSGS). Cela permettra de tester de nouvelles drogues ciblant les gènes candidats identifiés dans l'objectif 1 et qui seront susceptibles d'améliorer les effets de la chimiothérapie, tout en minimisant sa toxicité globale.

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, nous utiliserons des lots de 12 souris pour les expériences in vivo afin d'obtenir une puissance statistique suffisante pour conclure à partir des résultats obtenus. Nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. L'expérience de notre équipe dans l'utilisation de ces modèles, la multiplicité des paramètres mesurés, l'utilisation des méthodes statistiques adaptées nous permettront une exploitation maximale des données obtenues par

expérience afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser (2880 souris pour les 5 ans que durera ce projet). Nous aurons recours autant que possible à des techniques d'imagerie non invasive pour le suivi rapproché des animaux afin de réduire le nombre de souris utilisées et aussi privilégier leur bien-être. Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. 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. Les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction.

4676. L'utilisation d'anticorps thérapeutiques a révolutionné ces dernières années la prise en charge thérapeutique de certaines pathologies jusque-là réfractaires aux traitements classiques, comme certaines maladies infectieuses ou certains types de tumeurs. A titre d'exemple, on peut citer le rituximab (utilisé contre la leucémie lymphoïde chronique et la plupart des lymphomes B) ou le trastuzumab (utilisé contre certaines formes du cancer du sein), qui font partie des dix médicaments les plus vendus au monde à l'heure actuelle.

Pour éviter tout effet secondaire indésirable, un anticorps à visée thérapeutique chez l'Homme doit préférablement être d'origine humaine et non animale. Des anticorps humains dirigés contre des cibles d'intérêts sont donc désormais fréquemment isolés chez des individus immunisés (soit naturellement, soit après vaccination). Toutefois, les groupes d'individus chez lesquels ces anticorps existent peuvent se révéler excessivement rares, et leur identification – de fait – complexe.

Pour répondre à cette limitation, il est essentiel de pouvoir bénéficier d'un système biologique alternatif reproduisant la complexité du système immunitaire humain. En l'état actuel des connaissances, les meilleurs systèmes sont des modèles animaux humanisés pour leur système immunitaire (HSI). L'obtention d'animaux HSI repose sur la xéno-transplantation de cellules souches hématopoïétiques humaines permettant la génération et le maintien à long terme de différents types de cellules du système immunitaire humain. Les progrès récents permettent de vacciner expérimentalement un modèle animal HSI pour induire une réponse qui génère des anticorps ciblant l'antigène administré. Il est toutefois nécessaire d'évaluer dans ce modèle l'impact de différentes approches d'immunisation : le type d'antigène administré (par exemple une protéine purifiée ou un vaccin à ADN), l'utilisation ou non de facteurs modulant l'activation du système immunitaire, le protocole d'immunisation lui-même...

Au sein de notre laboratoire, nous avons établi un modèle HSI que nous souhaitons utiliser pour tester ces différents paramètres. Notre projet consiste à les vacciner avec différents vaccins et/ou différents protocoles de vaccination et de mesurer la réponse générée par le système immunitaire. Pour cela, des échantillons de sang seront prélevés régulièrement pour analyse des réponses anticorps et cellulaires. Il est prévu d'utiliser 2000 animaux HSI ou contrôle pendant 5 ans (soit 400 animaux par an), les effectifs par groupe expérimental étant calculés au plus juste en tenant compte de la variabilité expérimentale. Les animaux hébergés en groupe, seront suivis régulièrement au cours des expériences pour détecter et intervenir précocement lors de signes d'atteinte de l'état général.

4677. La sclérose en plaque (SEP) est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC) et représente la cause la plus fréquente du déficit neurologique acquis chez les jeunes adultes. Cette maladie est caractérisée par une destruction de la myéline (la gaine isolante permettant une communication rapide entre les neurones) qui entraîne une disparition progressive des neurones avec pour conséquence un déficit neurologique irréversible. Il est donc important de stimuler la réparation de la myéline pour minimiser les effets de la maladie.

Les lésions provoquées par la SEP se retrouvent dans les fibres nerveuses du cerveau et de la moelle épinière. La réparation des lésions par l'administration ciblée de molécules thérapeutiques représente donc un défi majeur pour les médecins.

Cette nouvelle approche thérapeutique est mise en application par une technique qui guiderait les molécules d'intérêt thérapeutique jusqu'au niveau de la lésion. Dans notre projet, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont modifiées ex vivo à l'aide d'un vecteur l'antiviral incluant le gène thérapeutique Sémaphorine 3F. Ces CSH ont la capacité à se différencier in vivo en cellules microgliales pouvant sécréter la molécule Sémaphorine 3F et migrer vers les lésions de la moelle épinière. Dès lors, les molécules Sémaphorine 3F, ainsi libérées, pourront recruter des cellules progénitrices des oligodendrocytes (CPOs) qui à terme répareront les lésions par un mécanisme de remyélinisation. Le but étant de favoriser les processus de réparation par les précurseurs (CPOs), par l'induction d'une surexpression de la molécule Sémaphorine 3F.

Cette étude ne peut être réalisée que sur un organisme entier vivant car aucun dispositif in vitro ou modèle in silico ne peut reproduire la complexité des mécanismes neuronaux. Le modèle rongeur a été choisi et permettra d'évaluer le potentiel de cette thérapie pour la réparation de la myéline.

Le projet prévoit d'utiliser 840 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.

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.

4678. La compréhension du mécanisme d'action des médicaments à visée neurologique permet d'optimiser leur utilisation chez les patients et d'améliorer leur réponse pharmacologique tout en prévenant l'apparition d'effets indésirables. Cela s'applique à de nombreuses classes de médicaments et concerne aussi bien les pathologies psychiatriques (dépression, schizophrénie, addiction, etc...) que les pathologies neurologiques (épilepsie, maladies d'Alzheimer, narcolepsie, maladie de Parkinson, etc...).

Les approches de pharmacologie in vitro permettent d'obtenir des informations sur ces mécanismes, en mettant par exemple en évidence les interactions d'un médicament avec les différents composants d'une cellule. Elles ne sont malheureusement pas suffisamment prédictives de l'efficacité et/ou de la toxicité du médicament qui dépend de son devenir dans l'organisme, de sa disponibilité au niveau des tissus cibles et notamment au niveau du cerveau dont la structure et la composition sont extrêmement complexes.

Le recours à un modèle in vivo, et donc un modèle animal, est alors indispensable. Toutefois, la mise en évidence de l'interaction des médicaments avec les différentes cibles pharmacologiques est particulièrement complexe, notamment au niveau cérébral. Elle nécessite, entre autres, l'utilisation de méthodologies d'imagerie non invasives, qui, évaluées et validées chez l'animal, sont transposables à l'Homme. Dans ce cadre, l'imagerie TEP (tomographie par émission de positons) est particulièrement pertinente car elle permet, grâce à un système de radiomarquage, de mesurer l'interaction du médicament avec sa cible biologique, voire de suivre sa distribution dans les différentes régions cérébrales.

L'objectif de l'étude est de mettre au point pour plusieurs médicaments un protocole d'imagerie TEP capable de révéler leur interaction avec leur cible biologique. Les doses chez l'animal sont parfaitement maîtrisées dans la littérature, en termes d'efficacité et d'effets secondaires. Ainsi, aux doses prévues dans cette étude, aucune toxicité ni aucune souffrance ne sont attendues. Pour réaliser les examens d'imagerie TEP, un radiotracer spécifique d'une cible pharmacologique donnée est utilisé. Ces examens sont réalisés chez des animaux « contrôle » ayant reçu un placebo, et chez des animaux ayant reçu le médicament testé à différentes doses.

Le nombre de rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés, sont au nombre de 24 animaux par étude (soit 240 sur 5 ans) ce qui est généralement suffisant pour établir une différence statistique existante sur l'effet du médicament et/ou de la dose administrée. Les animaux seront habitués à la manipulation avant le début du protocole ce qui permet de diminuer l'état de stress et d'améliorer leur bien-être. Ils seront hébergés en groupe dans une cage enrichie avec des accessoires de jeu et du matériel pour la fabrication de nids. Aucune douleur ni souffrance ne sont attendues dans ce protocole, toutefois des critères d'arrêt d'expérimentation ont été réfléchis et seront appliqués afin d'empêcher toute souffrance animale.

4679. Les fluides biologiques humains (urine, plasma) contiennent une multitude de composés de petite taille, les métabolites, impliqués dans les réactions qui se produisent dans l'organisme. Les métabolites sont très nombreux (plus de 40 000 référencés par le Human Metabolome Project). Ils sont le reflet du fonctionnement global d'un organisme ; l'absence ou la forte concentration d'un métabolite dans un fluide biologique peut être la conséquence d'une pathologie. Ils peuvent donc servir de biomarqueurs de pathologies (par exemple troubles neurologiques ou hépatiques). Il est aujourd'hui possible d'analyser le métabolome d'un individu grâce notamment à la spectrométrie de masse. Au cours d'une seule analyse, il est possible d'identifier des centaines de métabolites présents dans un fluide biologique. Pour autant, leur quantification précise est délicate : elle nécessite l'utilisation de standards internes, qui sont des molécules ne se distinguant des métabolites ciblés que par l'incorporation d'isotopes stables non radioactifs (par exemple intégration d'atomes de carbone 13 à la place des atomes de carbone 12). De telles molécules ne sont généralement pas disponibles commercialement.

L'objectif du projet est de réussir à produire la plus grande diversité possible de métabolites marqués au carbone 13 pouvant être utilisés comme standard lors d'analyses de métabolomes. Il existe aujourd'hui des techniques in vitro pour incorporer des isotopes non radioactifs dans des protéines mais pas dans des métabolites. Actuellement, la seule alternative est de produire ces métabolites marqués dans des petits mammifères tels que des rats ou des souris, espèces animales pour lesquelles il existe une forte homologie de métabolisme avec l'espèce humaine, car il n'est pas envisageable de réaliser ce type de marquage chez l'être humain.

Le projet consiste à nourrir des rongeurs avec une alimentation équilibrée marquée avec un isotope stable non radioactif, afin d'obtenir des fluides biologiques contenant des métabolites naturels marqués à plus de 90% par cet isotope stable. Ces animaux seront hébergés dans des cages permettant de récupérer les fluides biologiques d'intérêt (urine et fèces), leur condition d'hébergement étant particulièrement réfléchi pour minimiser l'inconfort. Des modules ont été ajoutés dans les cages pour que les animaux puissent s'y blottir et ne pas reposer en permanence sur la grille, ce qui à la longue abîme les coussinets des pattes des animaux. De plus, des périodes d'hébergement en groupe de 2 jours seront intercalées pour que les animaux puissent avoir des interactions sociales.

Le nombre maximal d'animaux inclus dans ce projet est de 15. Ce nombre est un maximum requis, néanmoins pourra être revu à la baisse lorsque la quantité suffisante de métabolites marqués sera obtenue. Des critères d'arrêt de l'expérimentation ont été prévus et seront mis en œuvre tout au long de sa réalisation.

4680. L'être humain est soumis à l'alternance du cycle veille-sommeil.

L'éveil est un état permettant la réalisation d'activités diverses, durant cet état de vigilance le cerveau reçoit des informations, les analyse pour y répondre de manière adaptée. Le sommeil lent est un état comportemental de repos, au cours duquel l'absence d'activité motrice permet à l'organisme d'assurer les régulations végétatives dans des conditions de dépense énergétique minimale. Le sommeil paradoxal quant à lui, est un état permettant la réalisation des rêves. Le "paradoxe" du sommeil paradoxal se révèle de manière évidente au niveau de l'activité électro-encéphalographique (EEG), où son empreinte ressemble à celle observée lors de l'état d'éveil, et ce malgré les différences cognitives fondamentales qui existent entre ces deux états.

L'objectif de ce projet sera, dans un premier temps, de « dénouer » le paradoxe du sommeil paradoxal. Dans un deuxième temps, de mieux comprendre comment les différents états de vigilance influencent la perception sensorielle au niveau du cortex, là où l'information est intégrée au plus haut niveau.

Toute information circulant d'un relai cortical à un autre est soumise à une modulation générée localement par des cellules spécialisées baptisées « interneurones ». Ce projet utilisera des modèles de souris transgéniques qui marquent spécifiquement ces cellules, permettant leur identification visuelle sous microscopie, et la manipulation précise de leur activité par différentes approches électrophysiologiques.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement :

Le sommeil ne peut s'étudier que dans les conditions *in vivo* chez l'animal entier. Les mammifères sont les seuls animaux possédant un cycle veille/sommeil/rêve semblable à celui de l'homme. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques régulant les états de vigilance (cycle veille-sommeil-rêve). La souris offre en outre des avantages conséquents (modèles génétiques et identification des neurones plus aisée) pour raffiner notre compréhension des processus d'intégration de l'information sensorielle à un niveau cellulaire.

2) Réduction :

220 souris seront utilisées dans cette étude sur une durée de 4 ans. Ce nombre de souris est établi au plus juste à partir de nos précédentes études ainsi que celles publiées par des experts du domaine, dans le but d'obtenir une reproduction fiable de nos expériences, en utilisant les tests statistiques adaptés. Nous avons minimisé le nombre de souris en utilisant chaque animal comme son propre contrôle. Nos procédures ont été établies afin de réduire au maximum le stress des animaux avec des procédures d'habituation appropriées et une attention particulière sera portée à leur bien-être.

3) Raffinement

Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Nos procédures ont été établies afin de réduire au maximum le stress des animaux avec des procédures d'habituation appropriées et une attention particulière sera portée à leur bien-être, notamment par l'inclusion d'un environnement enrichi. L'implantation des électrodes se fait sous anesthésie générale par du personnel compétent. Après la chirurgie les animaux sont laissés au repos un mois, pendant lequel leur bien-être est surveillé quotidiennement.

4681. On estime qu'environ 40 millions de personnes vivent avec le VIH dans le monde, dont 40% sans en avoir conscience. Plus de 2 millions de nouveaux cas se sont déclarés en 2015. L'établissement de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et sa transmission chez l'Homme restent donc des enjeux scientifiques et de santé publique majeurs. Malgré une prise en charge efficace d'environ la moitié des patients par la trithérapie, de nouvelles lignes de traitement doivent être développées, notamment pour les individus infectés par le VIH en situation d'échec thérapeutique.

Dans ce but, il est nécessaire de disposer de modèles permettant d'approcher des éléments de la physiologie humaine de manière expérimentale et prospective. Les modèles *in vitro* connus ne sont pas suffisamment pertinents car ils ne représentent pas la complexité de la physiologie humaine. Les modèles animaux humanisés pour le système immunitaire (HSI) permettent d'étudier le processus infectieux induit par le VIH. Nous avons établi de tels modèles chez des rongeurs par xeno-transplantation de cellules souches hématopoïétiques humaines. Ces lignées d'animaux permettent le maintien à long terme de différents lignages du système immunitaire humain. En outre, de nombreuses évolutions technologiques ont été appliquées sur les modèles HSI au cours de la décennie, améliorant sa fiabilité. Les animaux HSI donnent donc un accès de plus en plus pertinent à l'analyse de l'infection par le VIH *in vivo*, tout en permettant de tester l'efficacité et l'innocuité de nouveaux traitements anti-VIH.

Ce projet consiste à inoculer le VIH à des rongeurs humanisés et à les traiter avec des nouvelles molécules antirétrovirales expérimentales présentant une activité anti-VIH, en particulier pour évaluer leur efficacité à contrôler le processus infectieux durable qui se développe après l'inoculation du VIH. En pratique, le projet consiste en la mise en place d'une infection expérimentale par le VIH dans un modèle HSI par des injections, puis le criblage préclinique de nouvelles drogues antirétrovirales et microbicides dans ce système par des prélèvements sanguins.

Pour cela, des rongeurs, au nombre de 750 (sur 5 ans), sont issus d'élevages agréés à des fins scientifiques et sont hébergés en groupe dans des cages agrémentées de modules permettant de varier leurs activités. Ce nombre a été calculé au plus juste pour répondre aux demandes du test statistique utilisé. Une observation quotidienne des animaux permet de suivre leur évolution et détecter tous signes de douleurs non prévues. Toutes les interventions sur les animaux sont menées sous anesthésie, pour éviter la moindre souffrance.

4682. La recherche biomédicale et la compréhension des pathologies humaines ont largement bénéficié aux connaissances acquises chez la souris. Plusieurs décennies de recherche en immunologie menées sur des modèles murins ont ainsi permis d'appréhender dans le détail, les étapes du développement des leucocytes (cellules du système immunitaire), les rôles respectifs des différentes sous-populations lymphocytaires, les mécanismes orchestrant la régulation de l'immunité. Cependant, des différences notables existent entre les systèmes immunitaires de la souris et de l'homme. De plus, certains agents infectieux de pathologies humaines sont quasi exclusifs de l'espèce humaine, sans effet sur les espèces murines. L'étude de certains pathogènes causant des maladies infectieuses particulièrement dévastatrices chez l'Homme – par exemple les virus de l'immunodéficience humaine, de l'hépatite B et C, ou encore Plasmodium – est par conséquent souvent limitée par l'absence de modèles animaux totalement représentatifs de la situation humaine. Enfin, les limitations techniques ou éthiques empêchant de mener des études

expérimentales prospectives directement chez l'Homme sont nombreuses, et il existe de fait, un besoin pressant pour de nouveaux modèles expérimentaux spécifiquement adaptés à la recherche en immunologie humaine. Depuis quelques années, l'utilisation de souris humanisées émerge comme une approche particulièrement pertinente pour l'étude in vivo du développement et de la fonction des cellules du système immunitaire humain, que ce soit pour la recherche fondamentale, des études pré-cliniques ou des applications bio-industrielles. Ces modèles murins doivent notamment permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, définir les biomarqueurs des pathologies humaines étudiées et comprendre les mécanismes fondamentaux de ces pathologies.

Dans le cadre de la présente demande d'autorisation de projet utilisant des rongeurs, nous développerons de nouveaux modèles humanisés pour le système immunitaire, avec un double objectif :

- (i) mettre en place une infrastructure de production de modèles murins humanisés permettant de répondre aux exigences réglementaires, tout en maîtrisant au plus près le nombre d'animaux ;
- (ii) établir une plate-forme préclinique pertinente pour le développement et le criblage de nouvelles approches thérapeutiques, et entre autres éviter le recours aux primates non-humains.

Le modèle rongeur humanisé pour le système immunitaire humain est généré dans notre élevage agréé à des fins scientifiques. Il s'agit d'animaux immuno-déficients (principalement des souris âgées de 2 à 6 jours) préalablement conditionnés par un traitement myélo-ablatif (irradiation), puis transplantées avec des cellules humaines d'origine hématopoïétique. Tous les animaux sont hébergés dans des conditions sanitaires adéquates pour que leur état reste stable sur l'ensemble de la procédure, et que le niveau d'inconfort induit par le conditionnement reste modéré.

Il est prévu d'utiliser en moyenne 500 souris par an pour ce projet donc un total de 2500 animaux sur 5 ans. Les animaux sont hébergés dans des cages répondant aux exigences de la réglementation agrémentées de modules d'enrichissement leur permettant des activités proche de leur milieu naturel. L'hébergement se fait en groupe permettant aux animaux d'avoir des interactions sociales. Afin de garantir le bien-être des animaux, des points limites d'expérimentation et des observations quotidiennes permettront d'arrêter l'expérimentation en cours si c'est nécessaire.

4683. Si les maladies infectieuses ont représenté l'enjeu majeur de santé publique sur le siècle passé, la population actuelle doit faire face à la progression importante des maladies non-transmissibles, dont les maladies inflammatoires. La dérégulation du processus de l'inflammation est identifiée depuis plusieurs années comme une cause majeure chez l'Homme d'un large nombre de pathologies dites « auto-immunes », pour lesquelles subsistent de nombreux besoins médicaux non-satisfaits. C'est par exemple le cas de l'arthrite rhumatoïde, une pathologie multi-causale dont les mécanismes exacts restent difficiles à cerner et qui affecte 0,5 à 1% de la population.

Malgré des avancées incontestables, tous les traitements anti-inflammatoires actuels sont associés à l'apparition graduelle de résistances, à une efficacité partielle, et/ou à des effets indésirables liés à leur toxicité intrinsèque. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le contrôle de l'inflammation chez les patients reste donc une priorité, mais cet objectif est sérieusement contrarié par l'absence de modèles véritablement représentatifs du processus de l'inflammation humaine.

Pour répondre à cette limitation, et pour approcher au mieux des éléments de la physiologie humaine impliqués dans le processus inflammatoire, il est indispensable de disposer de modèles animaux humanisés pour leur système immunitaire (HSI). Les modèles in vitro qui existent actuellement ne sont pas suffisants pour reproduire ce niveau de complexité. Des souris humanisées HSI ont ainsi été créées. Ce modèle est constamment optimisé et amélioré pour approcher au plus près la physiologie du système immunitaire humain.

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouvelles thérapies anti-inflammatoires après induction d'un processus inflammatoire initié par injection d'un stimulus sur des groupes d'animaux HSI. Des prélèvements de sang permettront d'analyser les différentes populations de globules blancs et évaluer le niveau de biomarqueurs de l'inflammation. Le nombre de 25 animaux par groupe a été obtenu par des tests statistiques, ce qui est un minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables pour chaque analyse.

Dans le cadre de ce projet, les 1000 animaux (200 par an) permettront d'effectuer des analyses précliniques de nouvelles approches thérapeutiques anti-inflammatoires dans un contexte humain. Un protocole d'anesthésie est mis en place pour limiter les manipulations douloureuses des animaux (injections, prélèvements). Ils sont surveillés quotidiennement pour détecter tout signe de souffrance non attendue. L'hébergement en groupe, dans un environnement protégé sera enrichi de modules permettant de varier leurs activités pour améliorer leur bien-être.

4684. Avant la 1ère administration d'un nouveau candidat-médicament chez l'Homme, des études de pharmacologie de sécurité, recommandées par différentes directives internationales (ICH S7A et S7B et ICH M3(R2)) permettent préalablement d'évaluer la présence ou non d'effets secondaires de toute nouvelle molécule sur les grandes fonctions vitales (cardiovasculaire, respiratoire et système nerveux central). Les résultats obtenus déterminant le rapport bénéfice/risque et expliquant les effets observés, sont essentiels pour assurer la sécurité des patients.

Ces études sont réalisées tout au long des phases de développement d'un produit : du stade précoce (phase de recherche amont) au stade plus tardif (phase préclinique du développement) afin de sélectionner in fine un candidat-médicament.

Au stade précoce de la recherche d'efficacité et de sélectivité sur la cible thérapeutique, ces investigations permettent d'alerter rapidement sur d'éventuels effets indésirables en fournissant des informations cruciales :

- aux chimistes pour la synthèse d'autres structures chimiques présentant moins d'effets secondaires,
- aux biologistes pour l'optimisation, si nécessaire, des modèles expérimentaux prenant en compte ces potentielles alertes.

Dans le cadre de ce projet, seules les fonctions cardiovasculaires et respiratoires sont présentées. Plusieurs types de protocoles expérimentaux peuvent être conduits :



- Des procédures sur animaux vigiles et libres de tout mouvement pour évaluer les paramètres cardiovasculaires et/ou respiratoires (télémétrie et pléthysmographie, technologies répondant aux critères de raffinement et de réduction)
- Des approches non chirurgicales sur des animaux vigiles en contention pour évaluer les paramètres cardiovasculaires (échographie, cardiométrie et oscillométrie : technologies répondant aux critères de raffinement et de réduction).
- Des procédures sur animaux anesthésiés pour approfondir les mécanismes d'action des molécules testées.

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...), ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal et d'appliquer, si possible, la règle des « 3R » : raffinement, remplacement et réduction. Il est à noter que l'utilisation du primate non humain dans les expérimentations n'est jamais considérée en première intention sauf raison scientifique argumentée.

Après obtention d'un nombre suffisant de données scientifiques par expérimentation, une analyse statistique est réalisée par des biostatisticiens, afin d'optimiser les méthodes expérimentales employées et de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Les expérimentateurs sont formés et habilités aux gestes techniques impliquant l'utilisation des animaux et à l'observation des signes cliniques relatifs au bien-être de l'animal tout au long de son existence.

Ce projet couvre l'utilisation maximale pour 5 ans de : 370 primates non humains, 610 chiens, 150 lapins, 2000 cobayes, 4370 rats et 1480 souris correspondant à un total maximal de 8980 animaux.

4685. Les cellules ganglionnaires de la rétine (RGCs) sont les neurones intégrant l'information lumineuse, détectée au niveau des photorécepteurs, et la transmettant au cerveau par leurs axones qui forment le nerf optique. La dégénérescence des cellules ganglionnaires est l'une des principales causes de cécité dans le monde occidental. Cette dégénérescence conduisant à la cécité complète peut être la conséquence de divers états pathologiques, comme un traumatisme oculaire, une maladie oculaire telle que le glaucome, les maladies vasculaires telle que la rétinopathie diabétique, ou des neuropathies optiques. La communication entre la rétine et le cerveau est rompue et il n'existe à ce jour aucun traitement à ces atteintes des cellules ganglionnaires.

Ce projet vise à restaurer la perception visuelle en réintroduisant de l'information visuelle directement dans les zones des centres visuels supérieurs, le thalamus et le cortex visuel primaire.

Les approches thérapeutiques testées ici se basent sur l'optogénétique. Cette technique permet de rendre des neurones sensibles à la lumière en combinant le génie génétique et l'optique. Elle permet en particulier de stimuler spécifiquement un type cellulaire en laissant les cellules voisines intactes.

Dans la première phase du projet, nous apporterons une meilleure compréhension de l'organisation de la chaîne visuelle et définirons avec précisions les projections des neurones de l'œil aux centres visuels supérieurs en injectant dans l'œil des combinaisons de protéines Brainbow. La technique Brainbow permet de repérer chaque neurone par une couleur unique, obtenue par combinaison aléatoire de protéines rouge, verte et bleue. On peut ainsi observer les connexions du réseau neuronal.

L'activité neuronale sera imagée et enregistrée grâce à des techniques innovantes telles que l'imagerie ultrasonore et biphotonique, ainsi que par électrophysiologie.

Dans une seconde phase, nous appliquerons l'optogénétique en réintroduisant de l'information visuelle directement dans les zones des centres visuels supérieurs, le thalamus et le cortex visuel primaire.

Pour ce projet, nous utiliserons des primates non-humains, seule espèce ayant des propriétés anatomiques similaires à l'Homme au niveau des fonctions cérébrales et de l'anatomie 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 (85 adultes au maximum sur 5 ans) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Les animaux seront nés en captivité et proviendront d'élevages agréés à des fins scientifiques.

La mise en œuvre d'un suivi longitudinal par imagerie *in vivo* sur les animaux anesthésiés minimise le nombre d'animaux utilisés ainsi que la contrainte qui leur est imposée. Les techniques permettant de déterminer une activité cérébrale (ultrasons fonctionnels et mesures d'électrophysiologie) seront réalisées avec un minimum de chirurgies requises afin de réduire les gestes invasifs ainsi que le nombre nécessaire d'animaux.

Les actes chirurgicaux se feront sous anesthésie générale, et la douleur peropératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. 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 qui engendreraient une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques (antalgiques, analgésiques) n'auraient pas d'effet. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a des signes de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

4686. Afin d'anticiper une éventuelle pénurie des ressources en protéines animales pour l'alimentation humaine, de nouvelles sources protéiques doivent être identifiées afin d'assurer une alimentation durable. Dans ce contexte, il est envisagé de valoriser des protéines végétales jusqu'alors non intégrées dans l'alimentation humaine, notamment des protéines d'oléo-protéagineux (colza, tournesol, lin, lupin...). Toutefois, face à l'augmentation de la prévalence des allergies alimentaires, le risque allergénique de ces « nouveaux » aliments et ingrédients doit être évalué en amont. Cette évaluation doit considérer à la fois le risque de réactions croisées chez des patients allergiques à d'autres protéines issues d'aliments ou de pollen (les allergies croisées sont dues à la présence de structures moléculaires semblables ou très voisines dans des substances très différentes), mais également le risque de néo-sensibilisation.

Notre projet vise ainsi à évaluer le risque allergénique d'extraits protéiques de certains oléo-protéagineux et à étudier l'impact de procédés industriels sur leur éventuel potentiel allergénique. Ces travaux de recherche s'inscrivent dans un projet plus global d'évaluation de la digestibilité et de la qualité nutritionnelle de ces mêmes extraits protéiques. L'évaluation du risque de réactivité croisée sera réalisée à l'aide de tests alternatifs in vitro, grâce à des sérums de patients allergiques à d'autres aliments, limitant ainsi le nombre d'animaux en expérimentation.

Toutefois, aucun modèle in vitro n'est disponible pour permettre l'évaluation pertinente du risque de néo-sensibilisation. L'évaluation de ce risque nécessite l'utilisation d'un modèle animal permettant de tenir compte des interactions entre système digestif et système immunitaire. Ce modèle permettra ainsi de suivre la digestibilité gastro-intestinale d'un extrait protéique, matrice alimentaire complexe, le passage de la barrière intestinale par des protéines plus ou moins dégradées puis leur prise en charge par le système immunitaire associé à cette barrière pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique, allergique ou non.

Le nombre de 300 rongeurs, utilisés au cours de 5 procédures expérimentales, avec 10 individus par lot, a été calculé pour obéir aux minima nécessaires à l'analyse des données à l'aide de tests statistiques non paramétriques et permettre ainsi l'exploitation et l'interprétation des résultats.

Les rongeurs sont hébergés en groupe pour respecter leur mode de vie, et les méthodes expérimentales (sensibilisation par voie orale ou intra-péritonéale, prélèvement sanguin) ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre ; des protocoles d'anesthésie et d'antalgie seront réalisés si nécessaire. Leur état de santé sera contrôlé très régulièrement par une équipe formée et soucieuse du bien-être animal tout au long de l'étude, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée à la moindre détection d'un signe de souffrance.

4687. Le choriocarcinome est un cancer malin du placenta qui apparaît, le plus souvent, au cours du premier trimestre de la grossesse. Ce cancer métastase dans différents organes vitaux comme le foie et le poumon. Les métastases associées à ce cancer sont la principale cause du décès de la mère. Les mécanismes de sa progression sont inconnus à ce jour. De récentes études ont rapporté que ce cancer est associé à des mutations génétiques chez les patientes comme la mutation du gène nlrp7. En effet ces patientes développent des malformations bénignes placentaires, dénommées môles hydatiformes. Ces malformations évoluent dans 20% des cas en un choriocarcinome.

Nous travaillons actuellement, dans des systèmes in Vitro, sur les cellules issues de choriocarcinome humain (JEG3) et sur des trophoblastes humains « normaux », cellules dénommées HTR, et souhaitons développer un modèle animal de choriocarcinome afin de travailler in vivo. Le recours à un organisme entier vivant est en effet indispensable pour observer et comprendre la progression d'une tumeur dans son environnement physiologique afin de mettre au point des traitements.

Le modèle consiste à implanter des cellules JEG3 et HTR dans le placenta de souris immunodéficientes et gestantes. La souris a été choisie comme modèle pour notre projet parce qu'elle présente un développement placentaire similaire à celui de la femme. Nos données préliminaires in vitro ont démontré une modulation du caractère tumoral des cellules JEG3 et HTR suite à la modification de l'expression du gène nlrp7.

Le placenta des modèles animaux recevront des cellules dotées d'un marqueur bioluminescent (Luciférase). Le développement tumoral pourra être ainsi suivi en imagerie (technique considérée comme non invasive pour l'animal) sur un suivi longitudinal de plusieurs jours. Les métastases sont attendues dans le poumon, le vagin, le foie et l'estomac. Les modèles animaux seront euthanasiés à 19,5 jours de gestation (soit 1 jour avant le terme) afin de suivre le développement tumoral au niveau placentaire et au-delà de cet organe. Si celui-ci se confirme, nous envisageons dans un deuxième temps de traiter les modèles animaux avec des facteurs anti-angiogènes (facteurs empêchant la formation de vaisseaux intervenant dans le développement d'une tumeur) afin de tester le potentiel thérapeutique de ces derniers. Le modèle facilitera donc le développement de nouvelles approches thérapeutiques contre ce cancer.

Au total nous envisageons d'utiliser 105 animaux nés et élevés dans nos installations à des fins scientifiques. Ce nombre a été calculé au plus juste pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les méthodes expérimentales, réalisées sous anesthésie et analgésie, ont été choisies pour éviter l'apparition de douleurs lors des interventions. Les animaux seront surveillés tout au long du protocole, afin de détecter le moindre signe de souffrance, pour laquelle, une équipe interviendra pour soulager au plus vite l'animal.

4688. Le virus Herpès simplex de type 1 (HSV1) est un agent infectieux dont l'homme est le seul hôte naturel. La contamination (primo-infection) survient par la salive, généralement avant l'âge de 20 ans. Le plus souvent asymptomatique, elle est caractérisée par une migration du virus vers le système nerveux, où il entre en latence, c'est à dire qu'il y reste inactif pendant un temps plus ou moins long, parfois toute la vie. L'infection latente par HSV1 est retrouvée chez au moins 90% des personnes de plus de 50 ans. Le virus peut ensuite se réactiver et être à l'origine des « récurrences herpétiques », le plus souvent localisées dans la bouche (boutons de fièvre, 15% de la population), mais aussi dans l'œil. Dans ce dernier cas, c'est presque toujours un seul œil qui est touché. Plus de 90 000 français sont concernés par l'herpès oculaire, qui est aussi la première cause infectieuse de cécité unilatérale dans les pays occidentaux.

Les seuls traitements actuellement disponibles réduisent les symptômes des récurrences herpétiques, sans pour autant éliminer le risque de séquelles. Il n'existe aucun traitement préventif, permettant d'éradiquer le virus ou au moins de le maintenir en latence le plus longtemps possible et donc de réduire le risque de perte d'acuité visuelle.

Il n'existe pas de modèle in vitro de latence herpétique. En l'état actuel des connaissances, seul des modèles animaux peuvent reproduire le processus d'infection et de mise en latence du virus pour en comprendre les mécanismes. Il existe un modèle rongeur

d'infection herpétique qui reproduit une grande partie des données observées chez l'homme et qui suggère que les événements précoces de l'infection aiguë (différent entre le côté de la primo-infection et l'autre) déterminent le niveau d'infection latente puis la capacité de réactivation. Ceci ouvre des perspectives majeures pour le développement d'une méthode vaccinale innovante, visant à induire une infection « contenue » (comme celle observée du côté opposé à la primo-infection) afin de bloquer la possibilité de réactivation ultérieure. Les avantages escomptés de ce projet expérimental sont donc de comprendre les phénomènes précoces de la mise en place de l'infection herpétique latente et leurs effets sur la possibilité de réactivation. Les dommages escomptés sont liés à l'inconfort des animaux pendant la phase de primo-infection et l'éventuelle réactivation (périodes couvertes par l'utilisation d'anti-inflammatoires).

Dans ce projet, un minimum nécessaire de 880 rongeurs, nés et élevés dans des établissements agréés à des fins scientifiques sera utilisé. Ce nombre a été calculé de façon à réduire la variabilité inter-individuelle et donc le nombre total d'individus. Après répartition en groupes comparables, les animaux seront inoculés avec une première souche de HSV1 dans la lèvre (sauf les témoins), afin de contraindre une seconde souche de HSV1, inoculée quelques jours plus tard, à entrer dans un état de latence impropre à la réactivation. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum indispensable pour apporter la preuve statistique de l'effet escompté. Les animaux auront par ailleurs un accès à un enrichissement dans leur hébergement leur permettant de varier leurs activités. Ils seront surveillés régulièrement pour détecter tout signe de mauvaise tolérance et dans ce cas, un traitement adapté leur sera prodigué.

4689. L'IRM ou Imagerie par résonance magnétique est l'une des techniques d'imagerie médicale les plus récentes. Fiable et précise, elle permet d'obtenir des vues en deux et en trois dimensions de l'intérieur du corps. Elle s'avère particulièrement utile pour détecter des maladies ou troubles internes que des examens classiques n'ont pas réussi à identifier. L'IRM est devenue une technique de choix pour explorer les organismes vivants, qui présente en plus l'avantage d'être non invasive.

Couramment utilisée en milieu hospitalier sur l'homme, cet examen permet également de réaliser des études précliniques de mise au point de nouveaux diagnostics par IRM.

Préalablement à ces études, une longue phase de mise au point est nécessaire pour tester des nouveaux matériels non commerciaux (exemple, nouvelle antenne supra conductrice) ou vérifier des paramètres modifiés de l'IRM. La plupart de ces tests se font sur des objets « fantômes » mais l'étape finale de vérification doit toujours être réalisée sur un corps vivant. A ces fins, nous avons choisi le modèle rongeur qui est le modèle animal commun à toutes les études précliniques que nous réaliserons. Un même animal pourra participer à plusieurs mises au point, ce qui permettra de diminuer grandement le nombre d'animaux.

Lors de la mise au point, les rongeurs sont anesthésiés par anesthésie gazeuse ce qui permet d'éliminer le stress, de les immobiliser et d'avoir un réveil rapide.

8 nouvelles études environs sont réalisées chaque année dans notre laboratoire, avec un nombre moyen de 2 animaux par étude, nombre calculé pour être le plus juste pour obtenir des résultats fiables. Le projet étant déposé pour 5 ans, ce sont au total 80 animaux : qui pourraient être utilisés. Les animaux sont nés et élevés dans des établissements agréés à des fins scientifiques, ils seront hébergés en groupe dans des cages enrichies de modules permettant de varier leurs activités. Ils seront observés quotidiennement par des équipes en charge des soins. Les méthodes expérimentales sont choisies pour éviter toute souffrance de l'animal, toutefois des critères d'arrêt de l'étude sont prévus pour prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

4690. La perte osseuse peut être liée à différentes origines : traumatique, tumorale ou encore ou dégénérative. Le traitement des pertes osseuses est un problème complexe dépendant de l'origine et la taille de la perte ou encore des impératifs mécaniques. La recherche dans ce domaine est en constante progression afin de proposer des produits de comblement innovants et adaptés à chaque cas.

Ce projet a pour objectif de suivre au cours du temps l'évolution de biomatériaux implantables dans un modèle de défaut osseux créé au niveau de la Calvaria chez le rat. Ces biomatériaux pourront être de différentes technologies comme des adhésifs chirurgicaux permettant de créer un environnement optimal pour la réparation osseuse naturelle ou des substituts de greffe osseuse permettant de favoriser et d'accélérer la réparation osseuse naturelle.

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 biomatériaux implantables dans un défaut osseux dans un organisme vivant. En effet, ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la zone du défaut, les tissus environnants, l'activité de l'animal, etc.

Le modèle, réalisé chez le rat, est un modèle largement décrit dans la littérature. De plus, il s'agit d'un animal couramment employé en expérimentation animale, permettant ainsi d'une part de gérer plus facilement son bien-être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes (âge et sexe fixés).

Lors de 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. Après la chirurgie, les animaux et notamment les plaies opératoires seront observés attentivement deux fois par jour pendant 5 jours minimum puis quotidiennement afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate (par exemple application d'antiseptiques et/ou antibiotiques en cas d'infection des plaies). Afin de surveiller leur poids, les animaux seront pesés quotidiennement lors du suivi post-opératoire (5 jours) puis une fois par semaine.

Différents biomatériaux implantables seront évalués au cours du temps. Un maximum de 720 rats sera utilisé permettant d'évaluer l'efficacité des biomatériaux implantables testés.

L'évaluation des biomatériaux implantables pourra être faite selon trois modalités :

- Histologie et RT-qPCR : Ces techniques permettent de fournir des informations importantes dans le processus de formation de l'os.

- Imagerie par rayon X (CT et/ou  $\mu$ -CT) : Cette technique permet de suivre macroscopiquement et au cours du temps l'évolution des différents composants du défaut. 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. Ainsi, il n'est pas nécessaire de prévoir des animaux supplémentaires pour cette analyse. De plus, c'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen.

4691. Les glioblastomes multiformes de grade IV (GBM) sont des tumeurs astrocytaires malignes très invasives, particulièrement résistantes aux thérapies actuelles. La médiane de survie des patients reste très faible (de l'ordre de 15 à 18 mois). Les traitements actuels (exérèse chirurgicale associée à la radiothérapie et une chimiothérapie adjuvante utilisant le témozolomide (TMZ)) donnent des résultats cliniques faibles. Il est urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques et d'identifier de nouveaux marqueurs prédictifs et pronostiques de la réponse aux traitements pour améliorer le devenir de ces patients. Les microtubules (MT) jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions cellulaires, tels que la polarité, la migration, et la division cellulaire et ils sont une cible de choix dans la thérapie anticancéreuse. Nous nous intéressons en particulier aux interactions entre le réseau microtubulaire et la protéine Tau. Cette dernière a été décrite comme responsable de la résistance aux traitements anticancéreux dans différents cancers et comme marqueur d'invasivité et de potentiel métastatique. Nous nous sommes récemment intéressés à caractériser l'implication de la protéine Tau dans la progression des GBM. Nous avons montré que les cellules de glioblastome expriment la protéine Tau. La répression de l'expression de la protéine Tau dans des cellules de GBM induit une baisse des capacités migratoires et invasives avec une modification des propriétés d'adhésion et de cohésion cellulaire. De façon intéressante, une étude sur des coupes de tissus issues d'une cohorte de patients atteints de GBM a montré qu'une phosphorylation spécifique de Tau est significativement corrélée à un mauvais pronostic et à une diminution significative de la survie globale des patients. Nous sommes actuellement en train d'étudier l'implication de cette phosphorylation sur nos lignées cellulaires. Pour confirmer ces données, nous souhaitons tester l'implication de la molécule Tau et de sa phosphorylation dans un modèle animal de glioblastome *in vivo*. A cette fin nous grefferons localement (voie orthotopique intracrânienne) des cellules de glioblastome dans un modèle de souris immunodéficientes. Dans le souci du respect de la règle des 3R, outre l'anesthésie durant la chirurgie et l'analgésie post-opératoire, nous prélèverons lors du point final non seulement l'organe d'intérêt (cerveau) mais également le plasma afin de pouvoir rétrospectivement revenir sur l'expérience. Par ailleurs, afin de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, un maximum d'expériences sera réalisé *in vitro*. Le nombre d'animaux prévus dans chaque groupe est basé sur un calcul d'effectif permettant de prédire que nous avons 80% de chance d'arriver à un résultat statistiquement significatif. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront logées selon les normes requises avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) et en groupes de 4 à 6 individus par cage afin d'éviter le stress de l'isolement. Après xéno greffe nous suivront la progression de la pathologie en mesurant le poids des animaux tous les deux jours et en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques (posture, prostration, difficultés à se déplacer et à s'alimenter, déshydratation, ataxie). Lorsque les souris présenteront un poids inférieur de 20% à la moyenne du poids pour des animaux contrôle au même âge ou si des signes cliniques apparaissent, les animaux seront euthanasiés sans délai. Au total, un maximum de 550 souris est prévu pour la globalité de l'étude. Le projet s'inscrit dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement du glioblastome.

4692. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes et qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Une partie des recherches actuelles se concentre sur la mise au point de vaccins qui, en stimulant le système immunitaire, préviendraient de l'infection (vaccin préventif) ou aiderait le malade à lutter contre l'infection (vaccin thérapeutique). Toutefois, après 30 ans de recherches, nous ne disposons pas encore de tels vaccins capables.

Pour identifier les composantes du vaccin capables d'activer le système immunitaire plusieurs équipes européennes parmi les plus compétitives impliquées dans ces recherches joignent leurs forces dans un nouveau programme. Il s'agira d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires fondamentaux de la vaccination afin de définir la manière la plus efficace d'induire une réponse. De plus, les réponses à la vaccination sont des mécanismes complexes qui combinent à la fois des réponses par les anticorps mais aussi des réponses cellulaires, notamment les cellules de la peau, dites cellules dendritiques, spécialisées dans l'initiation des réponses de l'hôte aux pathogènes.

Le projet présenté ici s'attache à évaluer des candidats vaccins les plus avancés qui auront été auparavant strictement sélectionnés *in vitro* et chez le rongeur. A ce stade, aucun dispositif *in vitro* ou *in silico* ne peut reproduire la complexité d'une réponse immunitaire *in vivo*, il est nécessaire de recourir aux modèles animaux. Le modèle primate non humain a été choisi pour ce projet, car c'est le seul modèle animal susceptible à l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne, seul modèle reconnu à l'heure actuelle de l'infection par le VIH.

Le projet prévoit au maximum 30 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. De plus, pour éviter d'augmenter le nombre d'animaux inutilement, des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour limiter au maximum toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, imagerie, prélèvements de sang, de moelle osseuse, de fluides muqueux et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés.

En cas d'apparition d'effets inattendus ou points limite prévus dans le projet, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires en hébergements contigus permettant des interactions sociales et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

4693. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes et qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Une partie des recherches actuelles se concentre sur la mise au point de vaccins qui, en stimulant le système immunitaire, préviendraient de l'infection (vaccin préventif) ou aiderait le malade à lutter contre l'infection (vaccin thérapeutique). Toutefois, après 30 ans de recherches, nous ne disposons pas encore de tels vaccins capables.

Pour identifier les composantes du vaccin capables d'activer le système immunitaire plusieurs équipes européennes parmi les plus compétitives impliquées dans ces recherches joignent leurs forces dans un nouveau programme. Il s'agira d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires fondamentaux de la vaccination afin de définir la manière la plus efficace d'induire une réponse. De plus, les réponses à la vaccination sont des mécanismes complexes qui combinent à la fois des réponses par les anticorps mais aussi des réponses cellulaires, notamment les cellules de la peau, dites cellules dendritiques, spécialisées dans l'initiation des réponses de l'hôte aux pathogènes.

Le projet présenté ici s'attache à évaluer des candidats vaccins les plus avancés qui auront été auparavant strictement sélectionnés in vitro et chez le rongeur. A ce stade, aucun dispositif in vitro ou in silico ne peut reproduire la complexité d'une réponse immunitaire in vivo, il est nécessaire de recourir aux modèles animaux. Le modèle primate non humain a été choisi pour ce projet, car c'est le seul modèle animal susceptible à l'infection par le virus de l'immunodéficience simienne, seul modèle reconnu à l'heure actuelle de l'infection par le VIH.

Le projet prévoit au maximum 30 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. De plus, pour éviter d'augmenter le nombre d'animaux inutilement, des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour limiter au maximum toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, imagerie, prélèvements de sang, de moelle osseuse, de fluides muqueux et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés.

En cas d'apparition d'effets inattendus ou points limite prévus dans le projet, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés par paires en hébergements contigus permettant des interactions sociales et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

4694. Les maladies à prions sont des maladies neurodégénératives rares caractérisées par une accumulation anormale d'une protéine mal conformée, la protéine prion (PrP). Elles touchent à la fois l'Homme et l'animal. On distingue trois formes ; une forme sporadique (plus fréquente et de cause inconnue), une forme familiale (causée par une mutation génétique), et une forme acquise (comme ce fut le cas pour l'agent de la "vache folle" qui a réussi à franchir la barrière d'espèce et à causer la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, vMCJ, chez l'Homme). Que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal, les maladies à prions sont fatales et il n'existe actuellement aucun traitement. Même si le risque de transmission à l'Homme semble maîtrisé, il persiste actuellement un risque de santé publique lié à la transmission iatrogène de cette forme, notamment par transfusion sanguine avec la récente découverte d'une portion importante de porteurs asymptomatiques (près de 200 fois plus que de cas cliniques avérés).

La majorité des études du caractère infectieux des prions est réalisée chez l'animal de laboratoire, faute de modèle alternatif pertinent, et notamment sensible à la souche v-MCJ responsable de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Pour pallier à cela, nous développons un modèle original en 3D d'organoïde neuroectodermique, appelé « Mini-brain » (Lancaster et al., 2013) dérivé de cellules souches pluripotentes induites et différenciées, elles-mêmes obtenues à partir de cellules de peau d'individu adulte. Notre hypothèse est que ce système constitue un modèle in vitro alternatif beaucoup plus complet que ceux étudiés jusqu'alors et surtout correspond à des cellules nerveuses humaines c'est-à-dire totalement permissives aux souches de prion d'origine humaine. Afin de valider ce modèle dans le but d'étude de nouvelles molécules thérapeutiques et en complément des modèles animaux (simiens ou rongeurs), il nous faut confirmer qu'après infection, les Mini-brains présentent une accumulation de forme anormale de prion (PrP), marqueur spécifique des maladies à prion, liée à une réplication de la charge infectieuse initiale. Actuellement, la seule méthode permettant de mesurer un titre infectieux repose sur la transmission in vivo de la maladie à des individus sensibles. Pour cela, nous prévoyons d'exposer 504 rongeurs à différents extraits de Mini-brains exposés à des souches infectieuses.

Les rongeurs seront surveillés cliniquement tout au long de l'expérience, afin de pouvoir intervenir dès le moindre signe de souffrance par l'administration d'analgésiques spécifiques. A l'installation de signes neurologiques (hyperactivité, tremblements) ou de souffrance (dos courbé, amaigrissement) ou au terme de l'étude, les animaux seront euthanasiés et la présence de PrP anormale (marqueur spécifique des maladies à prion) sera recherchée dans leur cerveau et organes lymphoïdes par des techniques biochimiques et immunohistologiques, pour confirmation du diagnostic clinique.

Les protocoles expérimentaux ont été validés par une équipe de vétérinaire. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages enrichies de modules spécifiques aux rongeurs pour améliorer leur bien-être au quotidien.

4695. *Candida (C.) albicans* appartient à 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 chez des patients fragilisés, *C. albicans* peut coloniser excessivement la muqueuse digestive et la traverser. Ainsi, les candidémies et candidoses disséminées ont une origine essentiellement endogène à partir de la propre flore digestive du patient. L'interaction *C. albicans*-cellules intestinales (muqueuses ou immunitaires) reste encore mal connue alors qu'elle intervient à la fois au cours du commensalisme et dans la physiopathologie des candidoses systémiques. L'objectif du travail est de comprendre la relation de *C. albicans* - cellules épithéliales participant au rôle barrière intestinale et l'importance du recrutement local des cellules immunitaires.

Des travaux initiés dans un modèle *in vitro* de cellules entérocytaires ont permis la mise en place des outils nécessaires à l'évaluation de la virulence des souches de *C. albicans* et de la réponse hôte cellulaire. Deux isolats fongiques pathogènes ont ainsi été sélectionnés, démontrant des propriétés différentes de colonisation et d'infection *in vitro*. Un modèle murin de colonisation a alors permis d'observer les capacités, cette fois-ci, similaires de colonisation *in vivo* de ces souches. Le présent projet vise à documenter ces résultats par une approche de dissémination/infection systémique, c'est-à-dire d'injection directement dans le sang.

Quarante-cinq souris seront utilisées sur 3 procédures.

-La survie de souris Crl:CD1 sera étudiée lors d'infection systémique selon les modalités rapportées pour ce type d'étude. Dix animaux par souche fongique subiront une injection IV à la queue de levures afin d'induire une infection aboutissant à la mort de l'animal (attendue sous huit jours) (groupe témoin de même nombre non infecté). Les animaux seront suivis bi-quotidiennement, tout animal mort notifié et retiré.

-Ensuite, cinq animaux par souche subiront une administration IV puis seront euthanasiés après anesthésie un jour avant le premier décès observé au cours de la précédente expérience ou plus précocement si l'altération de l'état clinique de l'animal signe une infection sévère. Les organes (foie, rein, rate) seront prélevés pour dénombrement fongique et analyse histologique. Le nombre d'animaux choisi est classiquement utilisé pour ce type d'expérience.

-L'étude du recrutement de cellules immunitaires au niveau des plaques de Peyer est menée dans un modèle murin précédemment décrit pour l'étude des étapes précoces d'infection bactérienne. Cinq souris Crl:CD1 seront utilisées. Durant toute la procédure, les animaux sont maintenus sous anesthésie générale, une injection fongique est réalisée au voisinage de plaque de Peyer dans la lumière du tube digestif. Au bout d'une heure, l'animal est euthanasié par augmentation progressive de la concentration du gaz en CO<sub>2</sub> et les plaques de Peyer sont prélevées. La mise en évidence de types cellulaires (cellules M, dendritiques...) par observation microscopique et l'étude des gènes fongiques ou cellulaires impliqués lors de cette étape précoce d'infection sera réalisée.

Les observations de recrutement et interaction cellulaire ne peuvent être conduites que dans un modèle *in vivo*. L'ensemble de ces travaux constitue une démarche originale mettant en parallèle commensalisme-pathogénicité à la fois *in vitro* et *in vivo*.

4696. Le projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de nouveaux composés pour le traitement des surcharges hépatiques en cuivre, caractéristiques de la maladie de Wilson (maladie génétique rare qui rend l'organisme incapable de se débarrasser de l'excès de cuivre). Il pourrait conduire au développement de médicaments capables d'aller chercher le surplus de cuivre dans les cellules du foie pour l'éliminer de l'organisme des patients. En effet, si le cuivre est un oligoélément essentiel à la vie, sa présence en excès est toxique pour l'organisme. Ce dernier règle très finement la quantité de cuivre dont il a besoin, entre l'absorption à partir des aliments et l'excrétion dans la bile à partir du foie. La toxicité du cuivre est telle que la maladie de Wilson est fatale quand elle n'est pas diagnostiquée à temps. Elle est actuellement traitée par des chélateurs systémiques peu spécifiques du cuivre, qui ont d'importants effets secondaires et ne sont pas toujours bien supportés.

Des chercheurs ont imaginé aller chercher l'excès de cuivre directement dans les cellules du foie. Ils ont développé de nouveaux composés reconnus préférentiellement par ces cellules et capables d'y chélater le cuivre, sans perturber d'autres oligoéléments essentiels comme le zinc. Ces propriétés ont été confirmées *in vitro* sur des cellules de foie en culture.

Pour la suite du projet, il faut désormais envisager le parcours de ces nouveaux composés dans un organisme entier, en tenant compte de toute sa complexité. Il est nécessaire de tester ces composés sur des modèles vivants, des mammifères qui présentent le même métabolisme du cuivre que l'homme. Le choix s'est porté sur un modèle rongeur génétiquement modifié qui développe la maladie de Wilson, modèle déjà bien caractérisé depuis 1999. Le projet prévoit le recours en 3 ans à 294 animaux provenant d'élevages autorisés. Ce nombre a été déterminé en réduisant au maximum le nombre d'animaux pour chaque expérience tout en assurant sa validité. Ce projet permettra de tester l'effet des nouveaux composés sur le foie de rongeurs malades. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une échelle clinique journalière du niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les animaux modèles de la maladie de Wilson seront euthanasiés par exposition au dioxyde de carbone pour pouvoir observer par des coupes de leur foie l'état des cellules et mesurer le cuivre éliminé, selon le traitement adopté.

4697. La radiothérapie est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers. Au moins 70 % des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie.

Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose curative dans la tumeur tout en s'assurant que les tissus sains environnants soient préservés dans leur intégrité. Ceci est d'autant plus crucial pour les tumeurs radiorésistantes comme les gliomes (tumeurs cérébrales), qui sont actuellement traitées uniquement de façon palliative.

Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie. Pour ce faire, nous explorons de nouvelles approches et nous proposons de développer des techniques innovantes utilisant de nouvelles modalités de traitement.

Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur l'une de ces techniques innovantes qui a montré dans des études préliminaires un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très intéressant sur le contrôle de la croissance tumorale chez le rat.

Ces études seront complétées au sein de notre structure pour valider l'efficacité de cette nouvelle technique de radiothérapie en comparaison à celle utilisée actuellement chez le patient.

Nos critères d'évaluation pour l'efficacité de la technique vont porter sur la préservation des tissus sains environnants la tumeur et sur le contrôle de la croissance des tumeurs irradiées. Aussi, le recours à des méthodes alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux.

Pour la réalisation de ce projet, 567 rats seront inclus dans des groupes de traitement comportant différentes doses et différentes configurations d'irradiation. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. Notre projet va nécessiter de travailler sur des rats chez lesquels la taille plus importante du cerveau va être plus adaptée aux types d'irradiations proposées dans le cadre des procédures expérimentales.

En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de raffinement comme des rondins de bois ou de coton dans les cages.

Les effets toxiques ne sont pas encore connus puisqu'il s'agit d'expériences pionnières. Les animaux seront néanmoins observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

4698. L'utilisation de souris transgéniques représente un atout majeur pour l'étude des circuits et substrats cellulaires des comportements. Notre recherche s'intéresse aux bases neurobiologiques de la mémoire, avec une emphase particulière pour le rôle de l'hippocampe, et le recours aux modèles transgéniques existant nous permet d'analyser l'impact de l'inactivation ou la stimulation de populations cellulaires particulières sur les capacités d'apprentissage et de mémoire.

Le présent projet a pour but de générer deux nouvelles lignées transgéniques à partir de lignées existantes en vue de stimuler ou inhiber l'activité cellulaire de cellules de l'hippocampe et d'en analyser les conséquences comportementales. Nous proposons donc ici d'évaluer si le phénotype de ces nouvelles lignées est dommageable ou non en réalisant un suivi de développement de la naissance jusqu'à l'âge adulte.

La règle des 3R sera respectée en ce qui concerne la Réduction en suivant les recommandations du réseau ROCAD pour l'évaluation de la sévérité des phénotypes des lignées de souris génétiquement modifiées, et en effectuant une évaluation comportementale sur un échantillon représentatif de 14 souris par lignée. Afin de Raffiner nos expériences, un soin particulier sera apporté à la qualité des conditions d'hébergement. Enfin aucun Remplacement ne pourra être envisagé puisque cette saisine a pour objectif d'évaluer le phénotype des animaux générés.

4699. Parmi les tissus des vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables : il présente un développement et une croissance prodigieuse et possède de grandes capacités régénératrices. Ces capacités de croissance et de régénération font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. Ces cellules sont mises en place au cours du développement. Elles sont présentes dans toutes les masses musculaires, où elles résident dans un état de repos jusqu'à ce que des signaux notamment environnementaux viennent les solliciter afin de participer à la croissance et à la régénération musculaire.

Parmi les stimuli environnementaux, notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à l'impact d'une modification des taux en oxygène et/ou d'une exposition aux polluants environnementaux sur la biologie de la cellule satellite et l'architecture du muscle squelettique. Les principales approches mise en œuvre dans notre laboratoire pour répondre à cette question englobent un large éventail de techniques en biologie, en imagerie, des modèles de lésions musculaires et des souris modifiées génétiquement. Les protocoles expérimentaux chez la souris sont établis afin de pouvoir minimiser le nombre d'animaux soumis à expérimentation tout en conservant une masse suffisante pour assurer la reproductibilité et la cohérence statistique des observations, en s'efforçant d'utiliser tous les animaux issus des croisements si possible. Quand l'observation le permet, une approche préalable de remplacement par l'utilisation de cultures cellulaires est employée, ce qui permet par la suite de réduire le nombre d'expériences incontournables réalisées sur l'animal. Dans notre étude, nous utiliserons deux modèles de régénération musculaire, un modèle de régénération suite à une lésion chimique ou suite à une ligature de l'artère fémorale. Après les actes chirurgicaux potentiellement douloureux, les animaux sont suivis quotidiennement et une prévention des douleurs est assurée par un traitement analgésique approprié. Le polluant environnemental utilisé sera la dioxine, qui est le plus connu et le plus toxique des polluants environnementaux. Notre étude fera appel à 2700 souris au total réparties sur 6 procédures expérimentales.

4700. 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. En effet, les îlots provenant de donneurs en mort encéphalique et les délais d'acheminement et de temps d'ischémie pouvant aller jusqu'à 12h, des altérations du tissu se produisent malgré l'utilisation de solutions de préservations actuellement utilisées en clinique. Les dommages subis par le pancréas provoquent une perte importante de la masse d'îlots pancréatiques. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser plusieurs pancréas pour obtenir suffisamment d'îlots pour reverser le diabète du receveur. Afin de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, notre étude a pour but de tester de nouvelles molécules pour la préservation des organes et des îlots en culture.

Pour se faire, les îlots seront cultivés en présence de solutions oxygénantes, d'anti-inflammatoires et d'antioxydants, les pancréas seront préparés dans le but de préserver au mieux les îlots. À la suite de la culture, les îlots pancréatiques seront transplantés chez le Rat diabétique afin d'évaluer l'efficacité des traitements *in vivo*.

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. Pour chaque groupe expérimental 10 rats diabétiques seront utilisés afin d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques. Au total, 150 rats diabétiques seront utilisés pour la transplantation et 500 rats sains pour la récupération des îlots à greffer, portant le nombre total d'animaux nécessaires à 650. 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 sacrifier moins d'animaux pour le même nombre d'îlots.