



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

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

Résumés non techniques des projets autorisés (26)

2601- Selon l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé), les maladies parodontales peuvent être définies comme des maladies infectieuses multifactorielles. Elles sont caractérisées par des symptômes et des signes cliniques qui peuvent inclure une inflammation visible ou non, des saignements gingivaux spontanés ou provoqués d'importance variable, la formation de poches en rapport avec des pertes d'attache et d'os alvéolaire, une mobilité dentaire et peuvent conduire à des pertes de dents.

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

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

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

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

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

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

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

2602- Un arrêté du 12 mars 2015, du Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et des Droits des Femmes, modifie le contenu de la formation des IBODE (Infirmier de bloc opératoire diplômé d'état). Cette formation inclut les nouveaux actes et activités et concerne les IBODE déjà diplômés ainsi que les élèves IBODE.

La formation des IBODE passe par un apprentissage technique sur le vivant non humain. En effet les actes que les IBODE doivent pratiquer lors des interventions chirurgicales chez les humains doivent être parfaitement maîtrisés afin d'être capable d'aider le chirurgien si besoin est. Le seul moyen d'acquérir cette maîtrise est de pratiquer sur les animaux. En effet les IBODE doivent par exemple savoir suturer des organes, arrêter une hémorragie, pratiquer des gestes d'urgence.... Il est donc impossible de remplacer cette formation par des méthodes in vitro ou in silico.

Pour remettre à niveau 540 IBODE et former 60 élèves IBODE sur 5 ans, nous aurons besoin de pratiquer sur 200 porcelets (pour 5 ans) sachant que pour limiter le nombre d'animaux utilisés, 3 IBODE pratiquent sur le même porcelet.

Pour cette formation, nous utiliserons le porcelet Landras de 50 Kgs environs. Ces Porcelets proviennent d'un élevage agréé. Ils sont pris en charge de la même manière qu'un patient humain. Nous le tranquillisons avant de l'emmenager au bloc opératoire pour lui éviter de stresser, puis nous le mettons sous anesthésie générale, avec un respirateur. Nous contrôlons son rythme cardiaque, sa température. Nous lui injectons également des anti-douleurs, pour qu'il soit dans des conditions confortables et sans souffrance comme un humain au bloc opératoire. Tous les intervenants sont habillés comme au bloc opératoire (Pyjama, charlotte, masque, gants, surchaussures).

Les porcelets sont surveillés pendant toute la durée de l'intervention. A chaque injection de médicaments ou de prise de constantes, nous le notons sur la fiche personnelle d'anesthésie.

A la fin de l'intervention chirurgicale, les porcelets ne sont pas réveillés et sont euthanasiés par surdosage de pentobarbital.

2603- Le projet présenté ici a pour objectif de valider de nouveaux traitements anticancéreux pour l'ostéosarcome. L'ostéosarcome est une tumeur osseuse qui touche les enfants et les adolescents. Cette tumeur est particulièrement difficile à traiter puisqu'elle présente des résistances, innées et/ou acquises, aux thérapies conventionnelles. Pour ces raisons de nouveaux traitements contournant ces mécanismes de résistance sont nécessaires. C'est pourquoi dans ce projet, nous proposons de tester de nouvelles approches thérapeutiques (notamment anticorps anti-nétrine, inhibiteurs de kinases) pour l'ostéosarcome. La règle de remplacement pour le moment n'est pas possible, en effet, afin de pouvoir utiliser ces traitements chez l'homme il est nécessaire de les valider auparavant dans des modèles cellulaires et animaux. L'accent sera mis sur la réduction du nombre d'animaux et le raffinement.

Différentes études in vitro ont été réalisées avec les composés testés. Ces études ont permis d'identifier les composés les plus pertinents montrant un effet anti-prolifératif sur différentes lignées de cellules cancéreuses et d'en écarter d'autres. . Toutefois, l'étude de l'efficacité in vivo ou des réactions pharmacologiques et physiologiques de nouvelles drogues ou de drogues anticancéreuses pré-existantes nécessite d'avoir recours à l'animal pour un retour à l'échelle de l'organisme entier et l'observation éventuelle d'effets secondaires. Ces tests in vitro nous permettent ainsi de réduire le nombre d'animaux à inclure dans les tests in vivo (de 200 à 150).

Dans le projet présenté, nous allons tester l'efficacité de 3 nouveaux composés appliqués seul ou en combinaison dans un modèle d'ostéosarcome de rat qui reproduit autant que possible l'évolution clinique de la maladie. Au cours de ce projet, nous allons tester ces composés dans un modèle préclinique corrélé à son homologue humain. En effet, le modèle d'ostéosarcome de rat dont nous disposons reproduit l'agressivité et le potentiel métastatique de l'ostéosarcome humain.

Ces essais vont être réalisés sur 120 rats porteurs de tumeur progressive ; ce qui correspond inclure 15 animaux par groupe de traitement. Le taux de prise de greffe du modèle d'ostéosarcome est de 90 %, c'est pourquoi nous prévoyons d'inclure dans cette étude 150 animaux, afin de pouvoir traiter 120 animaux porteurs d'un ostéosarcome.

Ce nombre d'animaux est nécessaire puisque des échantillons de taille plus petite ne nous permettraient pas de comparer les différents traitements ni de mettre clairement en évidence quel est le traitement testé le plus efficace.

Pour pouvoir effectuer cette comparaison, les traitements seront administrés deux fois par semaine à des rats porteurs de tumeur. Les traitements seront poursuivis sur une durée de 3 à 4 semaines. Durant cette phase de traitements, nous suivrons l'évolution des tumeurs des animaux et pourrons ainsi voir quel traitement est le plus efficace à ralentir la progression tumorale. Tout au long de cette phase de traitement, un suivi clinique régulier sera réalisé afin de s'assurer du bon état général des animaux.

La règle de raffinement est aussi appliquée par l'utilisation de cages enrichies (igloo, tunnel, bâton à ronger) et tout au long de cette phase de traitement, un suivi clinique régulier sera réalisé afin de s'assurer du bon état général des animaux.

A l'issue de ce projet de recherche nous escomptons pouvoir valider de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des ostéosarcomes métastatiques et/ou en rechute. La mise à disposition d'un modèle préclinique permettant de tester de nouvelles approches thérapeutiques dans des conditions se rapprochant le plus possible de l'évolution clinique est un apport précieux. Les observations conduites dans notre modèle représentent un atout majeur pour la conception d'un dossier de demande d'autorisation d'essai clinique auprès des autorités réglementaires. Notre projet est donc véritablement dédié au transfert rapide de données précliniques vers le lit du patient.

2604- A la suite d'un infarctus du cœur, une partie du cœur peut mourir et ne plus pouvoir délivrer assez de sang au corps, c'est ce qu'on appelle l'insuffisance cardiaque. Le potentiel de réparation du cœur adulte humain étant limité, les patients ont recours à une transplantation du cœur lorsque la maladie est trop grave. Toutefois, les limites de cette transplantation font explorer de nouvelles pistes thérapeutiques, dont la transplantation de cellules. Pendant longtemps, on a pensé que les cellules injectées dans le cœur se transformaient en nouvelles cellules cardiaques. En réalité, elles semblent principalement agir en sécrétant des substances qui activeraient des mécanismes de cicatrisation du cœur lui-même. Ces substances sont regroupées dans de petites particules libérées par les cellules, appelées vésicules, qui pourraient être les médiateurs des effets bénéfiques des cellules greffées.

Ce projet s'ordonne donc autour de la question suivante : les effets thérapeutiques de la transplantation de cellules dans le muscle du cœur peuvent-ils être dupliqués par la seule administration des vésicules sécrétées par ces cellules ? Pour tenter d'y répondre, les principales étapes de ce projet sont : 1- comparaison des effets d'une injection de cellules et de l'injection de leurs vésicules dans un modèle animal d'insuffisance cardiaque ; 2- si nous démontrons un effet équivalent des vésicules par rapport à leur cellules d'origine, comparaison des sous-populations de vésicules afin de déterminer laquelle est responsable des effets bénéfiques observés ; 3- caractérisation du contenu de la sous-population la plus efficace (étude ne nécessitant pas d'animaux) ; 4- étude du devenir des vésicules dans le cœur ; 5- incorporation des vésicules dans un biomatériau (c'est-à-dire, un patch suturable sur le cœur ou une solution injectable) pour en permettre une libération dans le cœur prolongée et contrôlée chez le rat. Pour répondre à ces questions, le schéma expérimental de base sur l'animal est le suivant : création d'un infarctus par chirurgie, évaluation de la fonction cardiaque par échographie 3 semaines plus tard, administration du traitement par injections peu invasives ou implantation d'un patch sur le cœur, évaluation de la fonction cardiaque puis analyse microscopique du cœur afin de déterminer l'efficacité et l'effet du traitement 6 semaines après traitement. Au total, 480 animaux (396 souris et 84 rats) seront utilisés dans ce projet afin d'assurer un nombre d'animaux permettant une analyse statistique fiable et robuste. De plus, des études n'impliquant pas d'animaux (in vitro) vont être réalisées avant l'expérimentation animale pour choisir les meilleurs traitements administrés aux animaux, cela permettra de réduire

l'expérimentation animale. Des techniques peu invasives, de nombreux soins post-opératoires et un enrichissement des cages à l'animalerie seront mis en place afin de réduire la douleur et la souffrance des animaux. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînerait l'euthanasie anticipée de l'animal.

2605- Ce projet s'inscrit dans le développement préclinique d'une molécule candidat-médicament. Il a pour objectif principal d'étudier le devenir de cette molécule, lorsqu'elle est administrée chez le chien. Pour ce faire, des prélèvements sanguins et des biopsies de foie répétés seront réalisés après l'administration de la molécule.

Le nombre estimé de chiens est de 2 par étude, pour 5 études par an, soit un maximum de 50 chiens sur 5 ans.

Les prélèvements de sang et les biopsies de foie seront réalisés pour mesurer, sur 24 heures, la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents. Les chiens seront euthanasiés à la fin du projet, car divers organes doivent être prélevés pour compléter les dosages

Les prélèvements de sang seront réalisés sur les chiens vigiles. Les biopsies de foie seront réalisés à la faveur d'une sédation de très courte durée : l'utilisation de l'échographie permettra de réaliser le geste rapidement et en toute sécurité.

Remplacement: Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences in vitro) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être développée.

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

Raffinement: Dans ce projet, le raffinement sera effectué par :

- La mise au point de procédures rigoureuses
- La formation du personnel à la manipulation des animaux et aux techniques de prélèvement
- Un suivi étroit de l'état de santé des animaux
- Le recours à des procédures peu invasives et peu douloureuses
- La recherche de points limites et l'arrêt de la procédure (voire l'euthanasie des chiens) si nécessaire

2606- Le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer en termes d'incidence en France. Il cause actuellement plus de 16 000 décès chaque année, le plus souvent à cause d'une maladie métastatique principalement hépatique. La résection chirurgicale est, à ce jour, le seul traitement curatif, mais elle ne profite qu'à 20% des patients et n'est pas exempte des complications.

L'hémorragie est la complication principale de l'hépatectomie. Elle peut être contrôlée par clamage du pédicule hépatique. Mais ceci entraîne une ischémie et une altération de la fonction hépatique très délétère.

Depuis 2005, nous avons développé une nouvelle sonde produisant des ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU), adaptée à la chirurgie hépatique. Elle comprend un transducteur torique produisant des lésions de grande taille sans ponction et sans altération des structures de voisinage, et un système d'échographie en temps réel. Nous avons démontré, chez le porc, la faisabilité et l'innocuité de la résection hépatique assistée par HIFU, ainsi que la réduction des pertes sanguines. Nous avons également démontré, lors d'un essai clinique, l'efficacité de cette nouvelle sonde HIFU pour créer une nécrose homogène dans le parenchyme hépatique humain.

Notre but est le transfert chez l'homme de la résection hépatique assistée par HIFU afin de réduire les pertes sanguines, en particulier, pour les foies fragilisés par la chimiothérapie. Elle présente deux avantages majeurs :

1. réaliser tout type de résection en réduisant les pertes sanguines, et sans recours au clamage pédiculaire.
2. améliorer la qualité de la marge de résection.

Une association de la résection hépatique assistée par HIFU et de la destruction HIFU des métastases permettrait un traitement à visée curative, chez des patients porteurs de métastases hépatiques (MH) non résécables d'emblées. Cette nouvelle approche représenterait une avancée majeure dans la prise en charge des MH de CCR multiples et bilobaires.

Une étude prospective, randomisée, ouverte, de phase II, comparant la résection hépatique assistée par HIFU à la résection hépatique standard chez des patients porteurs de MH de CCR, traités par hépatectomie droite ou gauche doit débuter début en 2016. 50 patients seront inclus avec 3 chirurgiens différents.

L'utilisation d'un nouveau dispositif nécessite un temps d'adaptation tant pour les chirurgiens que pour l'organisation générale du bloc chirurgical. Une étude animale préliminaire permettra un entraînement préalable, la détection éventuelle de problèmes et l'organisation pratique des gestes à effectuer afin de sécuriser au mieux l'étude clinique à venir.

Pour réduire au maximum les nombres d'animaux, seulement 3 porcs seront utilisés et il s'agira de chirurgies sans réveil dans des conditions identiques à celles réalisées en chirurgie humaine.

2607- Ce projet a pour objectif de mettre au point, développer et commercialiser un équipement thérapeutique destiné aux phlébologues, leur proposant une nouvelle approche pour traiter les télangiectasies.

Cet équipement permettra pour la première fois d'utiliser une combinaison d'ondes ultrasonores focalisées qui agiront à travers la peau sur les vaisseaux disgracieux, en les détruisant. Cette destruction se fera par deux phénomènes physiques d'une part avec un échauffement modéré et d'autre part avec de la cavitation, qui est une création et une oscillation de bulles dans le milieu.

Un prototype de laboratoire est actuellement en phase de finalisation et comporte une véritable innovation thérapeutique puisque c'est un seul dispositif combinant l'émission d'ultrasons de puissance, une imagerie intégrée et un système d'éclairage transdermique.

Ce prototype a été testé in vitro et doit maintenant être testé in vivo avant d'envisager un passage à l'homme. Cette phase sur animaux permettra de s'assurer de l'absence d'effets secondaires et de déterminer les paramètres optimaux pour son utilisation future.

Le modèle animal choisi est le lapin et dans ce projet nous utiliserons au maximum 20 lapins.

Ce nombre a été déterminé afin de minimiser le recours à l'expérimentation animale tout en préservant l'interprétation qualitative de nos résultats.

Pour l'élaboration de ce projet, nous avons pris soin de prendre en compte la règle des 3R :

- « Réduire » au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en s'assurant que cet effort de réduction n'entraîne pas des résultats moins fiables.

- « Raffiner » : le modèle animal a été choisi avec soin afin qu'il puisse répondre aux besoins du projet et les précautions nécessaires seront prises afin de minimiser la souffrance animale au cours du projet.

- « Remplacer » : une première étape a consisté à réaliser de nombreux tests in vitro afin de déterminer une sélection restreinte de paramètres à tester in vivo et donc de réduire également le nombre total d'animaux utilisés.

Suite à cette étude et aux résultats obtenus, nous serons capables d'envisager des essais chez l'homme.

2608- L'alpha-synucléine est une protéine retrouvée en abondance sous forme agrégée dans des lésions observées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie de Parkinson ou d'atrophie multi-systématisée (MSA). Afin de recréer, d'étudier cette maladie et son évolution, des souris ont été génétiquement modifiées afin qu'elles expriment de l'alpha-synucléine humaine responsable de cas familiaux de maladie de Parkinson chez l'homme. Cette lignée de souris est appelée M83 et a la particularité de développer de manière spontanée des troubles locomoteurs, menant à une mort précoce de l'animal. Il a récemment été décrit qu'il était possible d'accélérer la survenue de la pathologie de ces souris en injectant dans le cerveau de celles-ci de l'extrait cérébral de souris M83 malade. Les souris ainsi inoculées développent des signes cliniques au bout d'une centaine de jours après inoculation, alors que la souris M83 non inoculée développe spontanément des signes cliniques à partir de 8 mois de vie. L'inoculation d'extrait cérébral de patient atteint de MSA à des souris M83 induit une accélération encore plus importante de la pathologie, ce qui a permis d'en conclure que cette forme d'alpha-synucléine retrouvée chez les patients atteints de MSA correspondait à une souche différente d'alpha-synucléine. Dans tous les cas, la symptomatologie de la pathologie développée par les souris M83 est associée à l'agrégation de la protéine alpha-synucléine dans les régions postérieures du cerveau de ces souris, et dans la moelle épinière. L'objectif de notre projet est de développer une stratégie pour contrer la propagation de l'agrégation de l'alpha-synucléine grâce à des vecteurs viraux. Cette stratégie repose sur l'injection chez la souris M83 de virus non pathogènes, génétiquement modifiés pour empêcher l'agrégation de l'alpha-synucléine. Après l'inoculation de ce virus, un challenge expérimental pourra être réalisé. Ce challenge consiste en l'inoculation intracérébrale d'extraits de cerveau de souris malade M83, issus de deux souches : la première est la souche qui entraîne spontanément le développement de la pathologie chez la souris M83, la deuxième est une souche humaine provenant d'extrait cérébral de patient atteint de MSA transmise à la souris M83. Les souris sont hébergées dans des cages enrichies. Cent souris adultes M83 et quatre-vingt souriceaux M83 seront utilisés pour ces expérimentations, nombres réduits au maximum et permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Ces souris feront l'objet d'un suivi clinique individuel afin de détecter la moindre apparition de symptômes propres à la lignée et éviter toute souffrance chez l'animal. A l'apparition des premiers signes, l'animal est déclaré malade et est euthanasié. Une analyse de la durée de survie de ces animaux accompagnée d'analyses biochimiques et immunohistochimiques permettra d'évaluer l'efficacité de notre virus génétiquement modifié dans sa lutte contre le développement de la maladie chez les souris M83.

2609- Le virus Ebola appartient à la famille des Filovirus. Cinq souches ont été identifiées : Zaïre, Bundibugyo, Soudan, Reston et Côte d'Ivoire. Le virus à l'origine de la flambée 2014 en Afrique de l'Ouest appartient à la souche Zaïre (appelée également souche Gabon). Le virus Ebola provoque une maladie aiguë et grave, souvent mortelle. La maladie à virus Ebola est apparue pour la première fois en 1976, lors de deux flambées simultanées à Nzara (Soudan) et à Yambuku (République démocratique du Congo). Yambuku étant situé près de la rivière Ebola, celle-ci a donné son nom à la maladie. Les flambées de fièvre hémorragique provoquées par le virus Ebola surviennent principalement en Afrique avec un taux de mortalité variant de 25% à 90% selon le type de virus et les conditions de prise en charge. La précocité et la qualité de cette prise en charge jouent un rôle important pour diminuer la mortalité associée à la maladie. La flambée qui a sévi en Afrique de l'Ouest (premiers cas notifiés en mars 2014) a été la plus importante et la plus complexe depuis la découverte du virus en 1976. Elle a produit plus

de cas et de décès que toutes les précédentes flambées réunies. Cette flambée a également comme particularité de s'être propagée d'un

pays à l'autre, partant de la Guinée pour toucher la Sierra Leone et le Libéria (en traversant les frontières terrestres), le Nigéria (par l'intermédiaire d'un seul voyageur aérien) et le Sénégal (par l'intermédiaire d'un voyageur arrivé par voie terrestre). D'après de récentes données, l'épidémie a provoqué plus de 27 700 cas dont 11 200 décès. Les pays les plus touchés (la Guinée, la Sierra Leone et le Libéria) ont des systèmes de santé très fragiles. Le 8 août 2014, il a été déclaré que cette flambée constituait une urgence de santé publique de portée internationale. Aucun traitement homologué n'a pour

l'instant démontré sa capacité à neutraliser le virus. De nombreux projets de recherche ont été initiés afin d'éviter une nouvelle épidémie.

OBJECTIF :

Le but de ce projet est d'étudier la sensibilité des souris IFNAR IFNAR-/- C57Bl/6 au virus Ebola (souche Gabon 2001 et Makona 2014) en déterminant, dans un premier temps, la dose létale 50% des deux souches du virus. Cette dose létale 50% permettra, par la suite, d'optimiser les procédures d'évaluation d'efficacité des traitements expérimentaux prophylactiques ou thérapeutiques.

PROCEDURE :

Ce projet comporte une procédure qui nécessitera 54 souris IFNAR -/- C57Bl/6. Ces dernières seront réparties en 9 groupes de 6 individus.

CONFORMITE AVEC LES 3 R :

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables.

Afin de raffiner l'expérimentation, une attention particulière sera portée sur l'enrichissement de confort (nids coton) et sur l'enrichissement de stimulation (abri en carton).

2610- La CDG IIc (Congenital Disorders of GlycosylationIIc, anciennement appelé Leucocyte Adhesion Deficiency II; LAD II) est une maladie héréditaire humaine monogénétique caractérisée par un déficit en transporteur du fucose (SLC35C1). Les patients atteints par cette maladie rare et orpheline montrent un cadre clinique très sévère. Les signes, souvent associés à des degrés divers, sont: retard psychomoteur et de croissance, infections bactériennes récurrentes et persistantes avec leucocytose, stigmata faciaux et morte précoce. Ce déficit peut être traité partiellement par l'administration de fucose (voie orale). Récemment, un modèle de souris de la maladie a été généré en inactivant le gène Slc35c1. Les souris déficientes en Slc35c1 présentent les mêmes symptômes des patients affectés par la CDGIIc. Le but de ce projet est d'évaluer le rôle de l'autophagie dans cette pathologie. L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. Son absence est souvent observée dans des maladies neuro-dégénératives et cancers. Nous avons des résultats (non publiés) in vitro, chez la levure et la drosophile, qui démontrent qu'une induction de ce processus induit une amélioration des symptômes de cette maladie. Pour confirmer et soutenir cette hypothèse, nous allons effectuer des traitements en combinant l'administration de fucose avec des inducteurs d'AP, toujours dans le but d'améliorer l'état clinique de l'animal et d'en retarder la mort. Nous souhaiterons effectuer cette étude utilisant des souris transgéniques C57Bl/6 Slc35c1-/- and Slc35c1+/- en comparaison avec des souris sauvages (total animaux sur 5 ans: 2862; 954 sauvages, 954 hétérozygotes et 954 homozygotes). Nous effectuerons des expériences de survie: les souris seront quotidiennement surveillées jusqu'à ce que celles-ci décèdent subitement. Ceci permet de définir l'espérance de vie moyenne pour chaque condition de traitement. Pour la réalisation de cette étude, nous chercherons de regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. Néanmoins nous pouvons utiliser moins de souris si nous trouvons une significativité avec moins de souris: le nombre d'animaux indiqué correspond au nombre maximal d'expériences prévues. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales invalident l'hypothèse de travail. La stabulation des animaux sera conventionnelle. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'angoisse (présence, dans les cages, des nids végétaux et/ou tunnels en cartons). Ce projet permettra à long terme d'élaborer une combinaison de traitements, pour le moment inédits, pour améliorer les symptômes ainsi que l'attente de vie des malades de CDGIIc.

2611- La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique fréquente, liée à la mutation du gène NF1, qui affecte 1 personne sur 3000 et qui se manifeste par l'apparition de nombreuses tumeurs bénignes (non cancéreuses), appelées neurofibromes (NFB). Toutes les personnes atteintes de NF1 développent des centaines de NFB cutanées qui peuvent être très invalidantes en termes d'apparence. Environ 30% des individus NF1 développent des tumeurs dites plexiformes, souvent localisées au niveau des racines des nerfs spinaux, et qui peuvent être douloureuses et dans de rares cas, aboutir au développement de cancers très agressifs de type sarcome. Actuellement, l'excision de la tumeur est le seul moyen de traitement. Le mécanisme de cette transformation maligne reste non élucidé mais implique, en plus de NF1, des mutations dans des gènes du complexe PRC2.

Malgré la prédominance des cellules de Schwann dans ces tumeurs, des nombreux travaux suggèrent l'implication de cellules souches. Cependant, du fait de leur rareté et de l'absence de marqueurs spécifiques permettant de les identifier, l'étude de cette population cellulaire est très difficile. Nous avons récemment montré que les dérivées des cellules des capsules frontières (CF: cellules présentes pendant le développement embryonnaire au niveau des racines des nerfs) migrent le long des nerfs jusque dans les terminaisons nerveuses de peau, les deux sites où les NFB apparaissent. De plus, nous avons découvert qu'une sous population des dérivées des CF possèdent des propriétés de cellules souches neurales. Les CF apparaissent donc comme le candidat idéal à l'origine de cette maladie.

Ce projet de recherche vise à exploiter nos découvertes afin de démontrer l'implication des dérivées des CF dans le développement des NFB cutanées et plexiformes et à étudier les mécanismes de transformation maligne. Pour cela, nous avons généré des souris qui portent à la fois la mutation Nf1 et un traceur (fluorescent) dans les CF et leurs dérivées. Nous attendons à ce que ces souris développent des NFB à l'âge adulte. Nous analyserons la localisation et la composition de ces tumeurs. La présence du marqueur fluorescent nous permettra d'identifier les cellules portant la mutation NF1 et d'étudier son effet avant l'apparition des premières tumeurs. Nous analyserons l'impact de la mutation Nf1 et de la double mutation Nf1/PRC2 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches dérivées des CF en culture. Enfin, nous réaliserons des

greffes de cellules souches dérivées des CF mutantes pour NF1 et NF1/PRC2, sous la peau et à proximité des ganglions sensoriels, afin d'évaluer leur capacité à former des tumeurs et d'analyser leur évolution vers des formes agressives.

Les expériences seront réalisées en accord avec application de la règle de 3R. Le modèle murin de NF1 est actuellement le seul outil génétique permettant de d'étudier le développement de cette maladie chez l'animal vivant. Il existe déjà plusieurs lignées des souris portant l'inactivation conditionnelle de Nf1. Toutefois, dans la majorité d'entre eux la mutation de NF1 conduit au développement des neurofibromes cutanées OU plexiformes, mais pas les deux. Les études réalisées au moyen de ces lignées n'ont pas abouti à l'identification de la population cellulaire qui est à l'origine de NF1. Cette étude devrait nous permettre: (i) d'investiguer l'implication des CF dans le développement des neurofibromes, (ii) d'étudier les mécanismes de formation des neurofibromes et de leurs transformation en tumeurs agressifs, (iii) de disposer, à plus long terme, d'un modèle animal de NF1 permettant d'investiguer l'effet des nouvelles molécules conçues pour le traitement de cette maladie.

La réalisation de ce projet nécessite l'utilisation de maximum 90 animaux portant l'inactivation de NF1 ou la double inactivation NF1/PRC2 dans les CF. Certains animaux seront utilisés pour l'analyse de l'effet de la mutation NF1 sur des cellules souches en culture, puis réutilisés pour des expériences des greffes afin de réduire le nombre total d'animaux. Pour réduire la douleur, les animaux subiront l'anesthésie locale avant l'intervention, puis l'anesthésie générale pendant l'acte chirurgical suivi de l'analgésie post-opératoire. En cas de signe manifeste de douleur ou de souffrance avérée les souris seront euthanasiées avant la fin du protocole expérimental.

2612- L'autophagie est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire et permet l'adaptation cellulaire en condition de stress (hypoglycémie, hypoxie, manque d'acides aminés essentiels, absence de facteurs de croissance ou détérioration des organelles cytoplasmiques). Son absence est souvent observée dans des maladies neurodégénératives et les cancers. Les dernières années ont vu l'émergence du concept de l'autophagie comme un processus protectif et anti-âge. Le but de ce projet est d'étudier l'impact d'une modulation de l'autophagie sur le métabolisme et vice-versa. Les résultats de ce projet de recherche fondamentale permettront de mieux comprendre la régulation de l'autophagie et faciliteront le développement de nouvelles interventions génétiques, pharmacologiques ou nutritionnelles visant à manipuler ce processus. Cette étude ne peut être conduite qu'in vivo car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation de l'autophagie systémique et son impact sur le métabolisme à l'échelle de l'organisme. Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris: immunocompétentes sauvages (n. 608); immunodéficientes (n. 608); transgéniques immunocompétentes déficientes en autophagie (n. 1216); immunocompétentes obèses (n. 608). Nous avons choisi la souris comme modèle pour la facilité d'hébergement, d'élevage (rapidité de reproduction et nombre de souris par portée) et l'accès au développement d'animaux transgéniques. Nous effectuerons des expériences dans des cages dites métaboliques. Nous administrerons différents inducteurs de l'autophagie que nous avons déjà testés in vitro. Toutes les molécules utilisées dans cette étude ne sont pas toxiques. Les souris, mâles et femelles, seront traitées avec les différents inducteurs d'autophagie en présence d'eau et de nourriture normale ou riche en graisses. La quantité d'eau et de nourritures ingérées, le poids de l'animal, le volume urinaire et la quantité d'excréments seront mesurés quotidiennement. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Pour la réalisation de cette étude, nous chercherons à regrouper les expérimentations dans le but de garder un nombre minimum d'animaux pour les groupes contrôles. De plus, les animaux sauvages issus des croisements nécessaires à l'obtention des souris transgéniques seront utilisés dans les expérimentations. Néanmoins, nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, des tunnels en cartons, et bâtonnets à ronger).

2613- Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du colon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Il est connu que les cancers de type MSI ont de meilleurs pronostics par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par une instabilité chromosomique. L'origine de cette instabilité chromosomique semble être liée aux mutations du gène APC (pour Adenomatous Polyposis Coli) qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la signalisation de la voie Wnt.

Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110. Nos résultats démontrent que HSP110 est fréquemment mutée dans les cancers MSI du colon, de l'estomac et de l'endomètre. Par des approches in vitro, nous avons démontré qu'une surexpression de la protéine mutante HSP110DE9 sensibilise les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine. Notre objectif est d'étudier le rôle de la protéine Hsp110DE9 dans la tumorigenèse MSI. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique où la mutation introduite au locus Hsp110 reproduit la mutation humaine (délétion de l'exon 9), permettant l'expression d'une protéine mutante de même nature que celle caractérisée chez les patients. Notre hypothèse est que la mutation Hsp110DE9 pourrait induire une modification du tableau clinique présenté par les souris APC KO (ralentissement du phénotype tumoral, spectre tumoral différent, staging).

Nombre/Type d'animaux :

Dans un premier temps ce projet impliquera l'utilisation de 30 souris transgéniques pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale

développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

2614- Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Les cellules cancéreuses MSI accumulent des ARN messagers aberrants portant un codon stop prématuré dans leur séquence, ce qui induit la production de protéines tronquées mutantes qui sont reconnues comme « étrangères » par le système immunitaire.

Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleurs pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par une instabilité chromosomique. L'origine de cette instabilité chromosomique semble être liée aux mutations du gène APC (pour Adenomatous Polyposis Coli) qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la signalisation de la voie Wnt.

Il a été suggéré que le meilleur pronostic des patients atteints de tumeurs MSI par rapport aux patients avec un cancer MSS soit lié entre autre, à une forte infiltration lymphocytaire de la tumeur MSI et indiquant une meilleure réponse immunitaire.

Notre objectif est de démontrer qu'in vivo l'inhibition du système de réparation MMR et le conséquent développement tumoral MSI, induit dans un contexte tumoral MSS (APCL/L) une modification de la réponse immunitaire en ralentissant le développement des cancers coliques de type polypes.

Il a été démontré que les patients atteints de cancer colique MSI à un stade métastatique présentent une meilleure réponse au traitement avec un inhibiteur du checkpoint immunitaire (le pembrolizumab). Ce système checkpoint contrôle le système immunitaire afin d'éviter une réponse trop importante ; une forte activité de ce système aurait un effet pro tumorale car les cellules cancéreuses échapperaient au contrôle du système immunitaire.

Le protocole pour ce projet consiste à créer des cohortes d'animaux qui développent des cancers coliques de type MSS (APC L/L et APC L/W) associés à un phénotype tumorale MSI (MSH2-/-). Ces souris double-mutantes seront suivies pendant l'initiation et la progression de la tumorigénèse colique pour apprécier un possible augmentation de la réponse immune en présence ou en absence d'un traitement au pembrolizumab.

Nombre/Type d'animaux :

Dans un premier temps ce projet impliquera l'utilisation de 40 souris transgéniques (fond génétique C57BL/6n) sans traitement au pembrolizumab. Si notre hypothèse est validée, nous arrêterons le protocole. Si les résultats sont ambigus, nous utiliserons 40 autres souris avec les différents génotypes d'intérêt, qui seront traités avec le pembrolizumab. Soit un maximum de 80 animaux au total pour ce projet.

Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

2615- Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Cette instabilité est responsable de l'accumulation au sein des cellules cancéreuses de mutations affectant leur patrimoine génétique et modifiant leurs propriétés biologiques. Nous étudions un type de cancer du côlon appelé MSI (pour « Microsatellite Instable ») car les mutations qui les caractérisent se concentrent sur certaines régions répétées du génome appelés microsatellites. Les cancers MSI représentent une catégorie de tumeurs de découverte récente.

Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome.

Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110. Nos résultats démontrent que HSP110 est fréquemment mutés dans les cancers MSI du colon, de l'estomac et de l'endomètre. Par des approches *in vitro*, nous avons démontré qu'une surexpression de la protéine mutante HSP110DE9 sensibilise les cellules tumorales aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine. Notre objectif est d'étudier l'impact de la mutation Hsp110DE9 dans chimiotoxicité cellulaire. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique où la mutation introduite au locus Hsp110 reproduit la mutation humaine (délétion de l'exon 9), permettant l'expression d'une protéine mutante de même nature que celle caractérisée chez les patients. Notre hypothèse est que la mutation Hsp110DE9 pourra induire sensibilisation des cellules normales aux traitements de chimiothérapie, notamment le 5-Fluorouracile et l'Oxaliplatine.

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 120 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Les modèles utilisés seront soit des souris sauvages de fond C57BL/6n soit des souris transgéniques HSP110 de9 KI/KI (C57BL/6n) qui ne présente pas de phénotype dommageable. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

2616- En 1999, le Comité Permanent de la Convention Européenne pour la protection des animaux dans les élevages a recommandé que des études portant sur des méthodes alternatives à la prise forcée d'aliment chez les palmipèdes soient mises en place dans les pays producteurs de foie gras (articles 24 et 25).

Depuis 2009 des essais ont été réalisés chez l'oie. Ces travaux ont consisté à exploiter le comportement d'hyperphagie (i.e. une importante prise alimentaire spontanée) observé à l'état naturel chez les oiseaux durant la période pré-migratoire pour constituer les réserves énergétiques nécessaires aux vols migratoires et ont permis de montrer que la distribution de maïs sec à volonté pendant 12 semaines, durant la période hivernale et après une phase de restriction alimentaire, associée à une réduction de la durée du jour en bâtiment obscur (de 10 à 7 h/j) durant la période automnale, permettait l'expression d'un comportement hyperphagique transitoire chez le jars, associé à un engraissement spontané très variable du foie. Les mécanismes de l'engraissement hépatique mis en place lors de l'engraissement spontané pourraient cependant différer de manière importante par rapport à ceux mis en place lors du gavage.

Ce projet a pour objectif d'explorer les mécanismes sous-jacents à l'engraissement spontané du foie pour un objectif finalisé d'optimisation du système de production de foie engraisé sans prise forcée d'aliment, mais aussi de déterminer la nature de l'engraissement mis en place. Il vise également à évaluer la possibilité d'induire un engraissement spontané du foie chez les deux sexes. Il repose sur une stimulation de la consommation des oies en phase hivernal, comme effectué dans les essais antérieurs avec 1) des cycles lumineux contrôlés simulant la période pré-migratoire automnale, 2) une alternance entre restriction alimentaire de 13 à 19 semaines d'âge et alimentation à volonté par la suite et 3) un accès à un aliment riche en énergie et avec une forte appétence pour les oies, le maïs, entre 19 et 31 semaines d'âge. Les animaux seront ensuite nourris avec un aliment croissance standard à volonté entre 31 et 35 semaines d'âge.

L'essai sera effectué sur les deux sexes de façon séparée avec 120 animaux par sexe. Deux lots témoins de 40 animaux chacun (un par sexe), non soumis au protocole expérimental de stimulation de l'engraissement hépatique, seront suivis de façon simultanée. A 19, 25, 31 et 35 semaines d'âge 30 animaux expérimentaux et 10 animaux témoins par sexe seront abattus afin d'évaluer l'engraissement et certains paramètres physiologiques associés.

Les 240 oies impliquées dans ce projet représentent un nombre optimal d'animaux à utiliser pour observer un effet des modalités testées. En effet, l'engraissement hépatique étant très variable (coefficient de variation de 45 à 75% dans les essais

antérieurs) des effectifs de 30 animaux expérimentaux par sexe et par âge d'abattage sont nécessaires afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. Aucune procédure provoquant de la douleur ne sera appliquée aux animaux durant leur élevage. Les oies expérimentales seront élevées en logement fermé à partir de 15 semaines d'âge jusqu'à leur abattage pour contrôler la durée d'éclairage. La conduite alimentaire permettra aux animaux de couvrir leurs besoins d'entretien tout au long du protocole.

2617- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula, partie centrale de la rétine, qui apparaît le plus souvent à partir de 65 ans. En France, environ 1,5 millions de personnes seraient atteintes de DMLA. C'est la principale cause de cécité non corrigée chez les personnes âgées dans les pays industrialisés.

Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu compris. Il existe deux formes de DMLA : atrophique et exsudative. La forme atrophique ou « sèche » est essentiellement caractérisée par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La forme exsudative (ou "humide") correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la choroïde qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies sous-réiniennes et accélérer l'évolution vers la cécité. Les traitements existants permettent seulement de ralentir l'évolution de la forme humide et il est nécessaire aujourd'hui, par une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques, de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Des études préliminaires ont pu montrer un effet bénéfique du blocage de l'action pharmacologique de l'angiotensine II (AngII) sur son récepteur (ATR1) sur l'évolution de la dégénérescence rétinienne dans des modèles mimant la forme exsudative et la forme atrophique de la DMLA. Afin de comprendre l'implication précise de l'angII dans la dégénérescence rétinienne, nous planifions dans un premier temps, d'utiliser des antagonistes du récepteur à l'angII dans des modèles expérimentaux des formes exsudative et atrophique de DMLA et, dans un second temps de caractériser les atteintes réiniennes spécifiques liées à une augmentation systémique chronique du niveau d'angII. Ces deux approches complémentaires devraient nous permettre de mieux comprendre le rôle de cette voie de signalisation originale dans le développement de la maladie.

La dégénérescence rétinienne par illumination est le résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires juxtaposés et ne peut être modélisée dans des systèmes *in vitro*. La photocoagulation Laser chez le rongeur est le modèle le plus utilisé à travers le monde pour « mimer » la DMLA exsudative et est aussi la résultante d'interactions complexes entre différents types cellulaires nous contraignant à avoir recours à l'expérimentation chez l'animal.

Afin de répondre à l'ensemble des interrogations sur l'implication du système rénine-angiotensine dans le développement de la DMLA dans sa forme exsudative et sèche, nous aurons recours à différentes espèces de souris notamment, des souris transgéniques invalidées pour certains gènes codant pour des protéines impliquées dans le développement de la pathologie. C'est le cas pour les chimiokines CCL2 et CX3CL1 mais également pour les apolipoprotéines E2 et E3. Nous estimons avoir besoin de 444 souris réparties dans les différentes procédures expérimentales afin d'apporter des réponses pertinentes et complètes aux questions posées.

Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les pools d'animaux contrôles. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et par le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des nids en cellulose et des bâtons à ronger. Si nécessaire (exemple : agressivité des mâles), des maisonnettes en carton seront introduites dans les cages de stabulation.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour notre étude. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2^o de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2618- Notre société développe des colles chirurgicales biocompatibles, biodégradables et flexibles qui peuvent avoir différentes applications cliniques. Un premier produit est en cours de développement et sera testé en clinique prochainement comme colle chirurgicale dans l'indication vasculaire.

Après avoir caractérisé nos produits par rapport à des critères chimiques et avoir évalué leurs propriétés mécaniques *ex vivo*, ce projet nous permettra d'effectuer une validation *in vivo*

Les objectifs de ce projet sont d' 1) évaluer et caractériser les propriétés adhésives et mécaniques des nos produits dans différents tissus chez l'animal, 2) évaluer la capacité de nos produits à promouvoir l'étanchéité et régénération des tissus après lésion 3) analyser la capacité de nos produits à délivrer localement des molécules thérapeutiques. Afin de réaliser ces objectifs, le rat a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence. Plusieurs groupes de rats seront utilisés et évalués dans le cadre des procédures expérimentales. Il s'agira de procédures expérimentales classiques, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 1464 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) Réduction : le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé au maximum tenant compte, quand applicable, des analyses statistiques qui seront effectuées; 2) Raffinement : une pré-sélection des produits testés sera effectuée avant les études et les procédures décrites prennent en compte des temps de récupération et un nombre d'essais visant à réduire le stress, la fatigue et la souffrance des animaux ; 3) Remplacement : quand cela sera possible nous effectuerons des études *ex vivo*, utilisant des organes d'animaux sacrifiés dans un autre contexte (autres études à l'ICM, abats de boucherie, etc.). Cependant, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne peuvent

pas être envisagées car ces modèles ne permettent pas de mimer les propriétés biologiques et mécaniques des organes entiers.

2619- Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) tapissent le fond de l'oeil juste derrière les photorécepteurs. Les fonctions de l'EPR sont nombreuses et toutes vitales pour la vision. Les photorécepteurs initient le signal visuel parvenant au cerveau dans un compartiment spécifique constitué de disques membranaires contenant les molécules photoréceptrices appelé segment externe de photorécepteur (SEP). Les SEP sont soumis à un fort stress oxydatif dû à leur exposition constante aux rayons lumineux. Pour limiter le stress, les SEP sont renouvelés en permanence et leur partie distale la plus âgée relarguée selon un rythme circadien. Ces SEP sont phagocytés par les cellules d'EPR qui leur font face à raison d'environ 30 SEP par cellule d'EPR. Ainsi les cellules d'EPR représentent les plus importants phagocytes de l'organisme.

L'absence ou la dérégulation de la phagocytose rétinienne entraînent respectivement des pertes de vision précoces ou tardives telles les dystrophies bâtonnets-cônes (rétinite pigmentaire atypique) ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge, principale cause de cécité chez les personnes de plus de 50 ans, et ceci dans différents modèles animaux ainsi que chez l'homme. Ces données soulignent l'importance de comprendre le fonctionnement de la phagocytose rétinienne, afin de pouvoir envisager des stratégies de traitements pour ces pathologies visuelles incurables à ce jour.

Les travaux du laboratoire visent à caractériser les mécanismes moléculaires régissant l'élimination quotidienne et rythmique des SEP. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence des différences entre mécanismes in vitro et in vivo, notamment dus à l'interaction entre photorécepteurs et EPR et au rythme circadien de cette fonction, ceci nous obligeant à utiliser des modèles animaux. Les projets en cours cherchent à caractériser la régulation de l'activité des récepteurs que nous avons précédemment identifiés et leurs voies de signalisation associées. Pour cela nous utilisons divers modèles de rongeurs : souris (10 lignées) et rats (2 lignées). Sur la durée des 5 années du projet, nous estimons que nous allons utiliser 1176 souris et 96 rats, soit 1272 animaux. Ces estimations tiennent compte d'un certain raffinement dans l'utilisation des animaux et nous voulons utiliser un nombre juste d'animaux tout en obtenant des résultats concluants, les tests statistiques utilisés dépendant du nombre de paramètres ou groupes comparés. Ainsi pour les comparaisons entre 2 conditions/groupes, le test t de Student est utilisé, alors qu'une ANOVA non-paramétrique avec post-test de Tukey est utilisée lorsque nous comparons plus de 2 paramètres. De plus, les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes mises en place dans les animaleries utilisées visent à réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. De plus, afin de limiter la souffrance animale, certains examens phénotypiques sont effectués en série sous la même anesthésie générale.

2620- L'objectif est de fabriquer des milieux de culture (exemple gélose Columbia, Chocolat...) et des réactifs pour le diagnostic biologique dans l'industrie pharmaceutique et agro-alimentaire. La culture des micro-organismes nécessite des milieux contenant des hématies intègres et / ou des éléments nutritifs du sang dont les caractéristiques sont propres à chaque espèce. Il n'existe pas de molécule similaire et performante aux caractéristiques des globules rouges et dérivés du sang.

Les sangs des différentes espèces sont utilisés pour la production de réactifs de diagnostic in vitro au moyen de méthodes reconnues ; ces réactifs permettent l'évaluation ou la détection ou le contrôle des modifications physiologiques chez l'homme pour les pathologies suivantes :

- Amibiase, infection parasitaire du gros intestin
- Identification de bactéries associées à différentes pathologies d'origine bactérienne
- Mononucléose infectieuse
- Toxoplasmose
- Cancers
- Hépatite B
- HIV anticorps et antigène
- Différentiation infection bactérienne ou virale pour antibiothérapie
- Hormones de la reproduction
- Bilan martial
- Rougeole
- Marqueurs de l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque
- Syphilis
- Détection/recherche de divers virus

Les produits biologiques (sang et sérum animal) sont évalués au niveau des analyses de risque produit comme des composants critiques qui ne peuvent pas être remplacés sans repasser par des phases de développement pour l'ensemble de ces réactifs ; il n'existe pas de solutions identifiées permettant d'en réaliser la substitution dont la validation serait de toute façon prohibitive.

Ce sang est prélevé sur des animaux "donneur" qui ne subissent aucun autre protocole (pas d'administration, ni injection de quelque substance).

Ce projet rassemble 7 espèces animales à raison de 3500 ovins, 125 équins, 45 caprins, 2 bovins, 2 porcs, 4 volailles, 5 cobayes.

L'effectif des animaux donneurs est adapté au plus juste pour répondre aux prévisions de production.

Toutes ces espèces sont hébergées en groupe, ceci leur assurant une vie sociale adaptée à l'espèce et garantissant un enrichissement efficace.

2621- La plateforme de Neurophysiologie in vivo du petit animal proposera des prestations et/ou une mise à disposition des équipements et œuvrera pour le développement de l'exploration neurophysiologique des modèles rongeurs de pathologies du système nerveux central et périphérique. En plus du développement, la plateforme formera les utilisateurs à diverses méthodes (mesure et chirurgie d'implantation). La plateforme utilisera donc des lots d'animaux à des fins éducatives et de recherche et développement. La règle des 3 R a été considérée pour la mise en place du projet:

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables. Les études in vivo développées dans ce projet permettent des approches fonctionnelles sans mise à mort de l'animal permettant un suivi pendant plusieurs mois réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisé

-Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par l'utilisation d'analgésiques et d'anti-inflammatoires en post-opératoire et une surveillance rapprochée des animaux jusqu'à l'euthanasie

-Remplacement. Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. La culture cellulaire, du fait de sa connectivité réduite, ne reproduit pas toutes les propriétés.

Nous estimons à 2 750 souris le nombre de souris dans les 5 ans pour ce projet.

2622- Le néocortex est responsable des fonctions cognitives et émotionnelles du cerveau les plus élaborées. Il est constitué de neurones assemblés en réseaux par l'intermédiaire de synapses, des assemblages multimoléculaires dynamiques dont la composition et l'organisation fine varient suivant les neurones qu'elles connectent et déterminent leur fonction. Les synapses sont remodelées au cours du développement, des apprentissages et des expériences liées à l'environnement. De nombreux troubles neuro-développementaux et psychiatriques, comme l'autisme, la schizophrénie ou le retard mental, sont liés à des anomalies du développement ou du fonctionnement synaptique. Il est donc particulièrement important d'en comprendre les mécanismes. Notre équipe étudie ces questions en utilisant le modèle de la souris. Les mécanismes du développement de son cerveau sont proches de celui de l'homme et il donne accès à un grand nombre d'outils génétiques. Dans ce projet, nous allons étudier les mécanismes synaptiques qui permettent la mise en place et le maintien d'un niveau d'activité approprié au bon fonctionnement du cerveau. Nous étudierons également si et comment ces mécanismes ont été modifiés au cours de l'évolution afin de comprendre les spécificités éventuelles des synapses humaines par rapport aux synapses de rongeurs. Enfin nous mettrons en place une nouvelle méthode de microscopie pour comprendre à l'échelle nanoscopique l'anatomie, l'organisation et la diversité des synapses dans les réseaux corticaux intacts.

La réalisation de ce projet se fera suivant la règle des 3R. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour répondre à la question scientifique, nous raffinerons les méthodologies utilisées et nous remplacerons dans la mesure du possible les modèles animaux par des manipulations in vitro, sur des cellules en culture.

Ce projet de recherche nécessitera environ 1200 animaux.

2623- La sécheresse oculaire est une pathologie de la surface oculaire qui entraîne des symptômes d'inconfort, une perturbation visuelle, et une altération du film lacrymal pouvant engendrer des lésions graves de la surface oculaire. Elle est accompagnée d'une augmentation de l'osmolarité des larmes et d'une inflammation locale.

L'objectif de ce programme de recherche est de mimer les effets observés chez les patients, sur des modèles murins, afin de caractériser les acteurs moléculaires intervenant dans l'étiologie et le développement de la pathologie. Durant ce projet, seront observés, les effets in vivo et ex vivo de la surface oculaire lors de l'administration oculaire de composés thérapeutiques (principes actifs et formulations).

Différents modèles de sécheresse oculaires seront élaborés afin d'aborder cette pathologie dans toute sa complexité. Nous utiliserons 5 modèles, certains validés par la littérature et d'autres en cours d'investigation. Grâce à ces modèles, plusieurs stratégies thérapeutiques seront testées.

Des souris mâles et femelles C57BL/6J adultes seront utilisées ainsi que des souris transgéniques invalidées pour le gène codant pour CCR2.

Au total 600 souris seront nécessaires pour la conduite de ces projets expérimentaux.

L'utilisation des animaux est nécessaire pour l'élaboration de modèles physiologiques de sécheresse oculaire, car c'est une pathologie multifactorielle soumise aux réponses immunitaires et à l'homéostasie de l'animal.

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

2624- Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'AVC est souvent responsable de séquelles qui affectent la qualité de vie des patients. Les atteintes peuvent être motrices, sensibles, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire). En outre, les dépressions sont fréquentes. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. La metformine est une molécule déjà ancienne couramment utilisée dans le traitement du diabète de type II, et qui est de plus le traitement de première intention chez le patient diabétique en surpoids. Des travaux de recherche ont permis de suggérer un effet neuroprotecteur de la metformine au cours des AVC et des accidents ischémiques transitoires. Le but de ce projet est d'évaluer l'impact d'un traitement par la metformine sur les atteintes ischémiques post-AVC dans un modèle d'insuffisance rénale chronique (IRC) chez la souris. Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin

de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ces expériences ne peuvent à l'heure actuelle être réalisées qu'avec l'utilisation de modèles animaux, la complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les AVC ne permettant pas les études *in silico*. Le choix du modèle animal s'est porté sur la souris suite à la possibilité de disposer d'un modèle d'IRC chez la souris au laboratoire. Le nombre d'animaux est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux. Les expériences décrites dans ce projet nécessitent 120 animaux, 30 souris pour une expérience préliminaire afin de vérifier la tolérance de la metformine à la posologie envisagée chez les souris avec IRC et 90 souris pour les expériences avec metformine et AVC.

2625- Le cervelet contient plus de la moitié des neurones du cerveau et constitue un des plus formidables opérateurs cérébraux. L'organisation du circuit cérébelleux l'a fait comparer à un filtre adaptatif, capable d'ajuster finement les actions du corps sur l'environnement. Ce circuit et les opérations qui y sont implémentées sont largement connus grâce à l'analyse de réflexes élémentaires. Toutefois, la plus grande partie du cervelet est engagée dans un dialogue avec les grandes structures cérébrales (thalamus, cortex, ganglions de la base). De nombreuses données cliniques montrent que ce dialogue est perturbé dans un grand nombre de pathologies développementales (autisme,..), neurologiques (Parkinson, dyskinesies, dystonies, etc) et psychiatriques (anxiété,..).

Les projets réalisés dans notre équipe visent à comprendre la nature et la fonction de ce dialogue. Nos travaux s'intéressent à la physiologie cellulaire et à l'activité intégrée du réseau, notamment dans le cervelet et dans les circuits moteurs cérébello-corticaux. Nous sommes tout particulièrement intéressés à comprendre les interactions, en conditions normales et pathologiques, des différentes structures des voies qui lient le cervelet au télé-encéphale. Nous combinons pour ces études des approches méthodologiques d'optogénétique (souris transgéniques et infections virales), d'électrophysiologie *in vivo* chez l'animal anesthésié et en comportement, de traçage anatomique, etc... Nous mettons également en œuvre des méthodes avancées de traitement du signal et d'analyse de l'activité de réseau. Ces approches ne peuvent pas être appliquées sur l'homme directement, et nous devons utiliser des modèles animaux. Nous avons choisi dans notre équipe le modèle des rongeurs car il permet de réaliser des expérimentations sur animal vivant, impératif pour étudier le comportement normal et pathologique. De plus, les rongeurs nous permettent de bénéficier des nombreux développements récents dans le domaine de l'optogénétique pour déterminer le rôle spécifique de certaines catégories de cellules dans l'activité des circuits cérébello-corticaux.

Dans ce projet, nous nous efforçons de respecter au mieux la « règle des 3R ».

- Réduire. Le nombre d'animaux utilisé est choisi comme le minimum permettant d'établir la significativité statistique des mécanismes étudiés. Nous pouvons utiliser le même animal pour plusieurs protocoles. Ces protocoles sont bien établis et maîtrisés par les membres de l'équipe.

- Raffiner. Dans tous les cas, un suivi précis du stress ou de l'inconfort ressenti par les animaux est effectué afin de les supprimer au maximum. Des tests systématiques et des critères objectifs sont mis en place pour évaluer l'état des animaux et détecter toute souffrance. Seules des personnes entraînées réalisent les manipulations d'animaux afin de suivre les règles de bonnes pratiques.

- Remplacer. Nous combinons nos approches expérimentales et les méthodes avancées de traitement du signal et d'analyse de l'activité de réseau avec de la modélisation. Ce couplage entre expérience et théorie permet ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet utilisera 200 rats et 400 souris.

2626- Tau est une des protéines associées aux microtubules qui les stabilisent au cours du développement neuronal, de l'établissement de la polarité cellulaire et du transport intracellulaire. L'accumulation anormale de la protéine tau, son hyperphosphorylation et son agrégation dans les neurones représentent une des caractéristiques majeures de la maladie d'Alzheimer (MA) et d'autres maladies neurodégénératives telles que la démence fronto-temporale (FTD) et la paralysie supranucléaire progressive (PSP). Outre son accumulation dans les neurones, la protéine tau peut également être libérée dans l'espace extracellulaire. De ce fait, des niveaux élevés de tau (totale et phosphorylée) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) sont considérés comme biomarqueur de la MA. Chez les souris transgéniques modèle de la pathologie tau (P301S), la concentration de la protéine dans le liquide interstitiel est réduite avec l'âge, alors qu'elle est augmentée en fonction du temps dans le LCR. Malgré ces découvertes, nos connaissances sur l'homéostasie de tau au cours du vieillissement restent très limitées. Nous proposons 1/ d'étudier le rôle de l'activité synaptique sur la pathologie tau et 2/les effets thérapeutiques des neurostéroïdes sur la pathologie tau. Pour ce faire, nous utiliserons 210 souris pour l'étude 1 et 90 souris pour l'étude 2. Nous utiliserons les souris P301S et leurs contrôles. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes-le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées.

2627- L'objectif de ce projet est de 1) évaluer/valider les techniques utilisées sur la plateforme chirurgie rongeur, 2) former les utilisateurs aux techniques chirurgicales et d'euthanasie mises à disposition. Afin de réaliser cet objectif, plusieurs lots de rongeurs seront utilisés et soumis aux procédures expérimentales. Il s'agira de procédures expérimentales classiques, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. Lors des analyses, différentes variables seront considérées

comme le sexe, la souche et l'âge des animaux. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 570 souris et 390 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas d'étude complexe, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées.

2628- L'étude de l'amélioration de la performance physique constitue un enjeu important pour la lutte contre la perte de masse musculaire liée à l'âge ou à des pathologies telles que les cancers, les myopathies... Ces problématiques constituent une partie des objectifs de notre laboratoire spécialisé dans l'étude intégrée de la fonction musculaire, depuis les mécanismes moléculaires jusqu'aux effets sur l'organisme entier.

Deux extraits naturels de plantes utilisés chez l'homme en usage commun seraient de bons candidats pour stimuler la synthèse protéique intramusculaire, permettre l'augmentation de la masse musculaire et conduire à l'amélioration de la performance qui en découlent.

Une première étude réalisée in vitro sur des cellules musculaires en culture a déjà été réalisée. Nous avons observé une forte augmentation de la synthèse protéique. Ces résultats positifs nous conduisent à valider cet effet in vivo et à évaluer si cette stimulation est associée à une augmentation de la masse musculaire et une amélioration de la performance physique en vue de les tester dans des essais cliniques chez l'homme. Ces deux paramètres ne peuvent être étudiés que sur l'animal c'est pourquoi nous avons choisi le modèle du rat connu pour ses capacités à répondre à un entraînement.

Nous envisageons donc de conduire deux études successives et liées impliquant au maximum 144 rats. La première vise à rechercher une stimulation de la synthèse protéique intramusculaire consécutive à l'administration des extraits A et/ou B, et le cas échéant à déterminer la dose optimale pour observer l'effet le plus important. Cette première étude est un préalable important afin de limiter au strict minimum le nombre de groupes et donc d'individus dans la deuxième étude. Les tests de doses nécessitent 14 groupes de 8 individus afin de pouvoir conduire une analyse statistique concluante.

Les résultats de cette étude devraient nous indiquer si nous engageons la seconde étude qui vise à rechercher une augmentation de la masse musculaire et l'amélioration de la performance consécutive à l'administration des extraits A et/ou B. Nous limiterons alors les tests à 4 groupes de 8 individus.

Enfin, il est important de signaler que nous porterons une attention particulière au bien-être des animaux durant notre étude. Ce paramètre est d'autant plus important qu'il est indispensable à l'entraîn des animaux pour réaliser l'exercice physique et augmenter leur performance.

2629- Les récepteurs à dépendance constituent une famille fonctionnelle de récepteurs membranaires présentant la particularité d'induire la mort des cellules (ou apoptose) en absence de leur ligand. Les cellules exprimant ces récepteurs sont donc dépendantes de la présence du ligand pour survivre, d'où leur nom de récepteurs à dépendance. Notre hypothèse est que ces récepteurs puissent jouer le rôle de suppresseurs de tumeurs en induisant la mort des cellules tumorales qui se développent en excès et/ou en dehors d'une zone normale par rapport à la disponibilité en ligand. Les cellules tumorales pourraient contourner ce phénomène soit en perdant l'expression des récepteurs à dépendance, soit en acquérant la capacité de produire elles-mêmes leur propre ligand. Notre étude vise donc à évaluer la pertinence d'une nouvelle stratégie thérapeutique visant à perturber l'interaction ligand/récepteur dans les mélanomes exprimant le ligand. Cette étape sera facilitée par la disponibilité de souris nues qui seront xénotreffées avec des lignées cellulaires de mélanomes présentant des taux d'expression de ligand élevés.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

Le mélanome est le cancer de la peau présentant le taux de mortalité le plus élevé et cause près de 48 000 décès par an à travers le monde. Selon la rapidité avec laquelle le diagnostic est établi, la résection de la tumeur par chirurgie locale peut s'avérer suffisante. Néanmoins, en cas de rechute ou de dissémination de la tumeur, traiter le mélanome devient un véritable challenge thérapeutique. Notre projet permettra potentiellement d'identifier une nouvelle stratégie thérapeutique en utilisant le nouvel anticorps développé dans notre laboratoire qui cible l'interaction ligand/récepteur et de comparer son efficacité avec les chimiothérapies conventionnelles utilisées en général dans le traitement du mélanome.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Un criblage d'expression du ligand sur une cohorte de 24 lignées cellulaires de mélanomes a été réalisé montrant que 6 lignées surexpriment le ligand et répondent à l'activité apoptotique de l'anticorps anti-ligand (Remplacement). Nous souhaiterons donc évaluer la pertinence d'une stratégie thérapeutique visant à perturber l'interaction Ligand/Recepteur dans les mélanomes exprimant le ligand. Pour ce faire, nous testerons l'efficacité de l'anticorps anti-ligand sur des souris immunodéprimées nude xénotreffées avec les 6 lignées cellulaires de mélanomes présentant des taux d'expression de ligand élevés. Aussi, nous souhaiterons comparer l'efficacité de notre Anticorps avec les chimiothérapies conventionnelles utilisées en général dans les traitements du mélanome.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (Réduction), nous optimiserons et restreindrons au maximum le nombre d'animaux par groupe (contrôle versus traité), tout en permettant une interprétation statistique des résultats.

Un plan de surveillance adapté (Raffinement) sera enfin mis en place de manière à éviter l'apparition de signes de souffrance. Après la greffe des lignées de mélanomes, les animaux seront surveillés de manière régulière (2 à 3 fois par semaine).

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, 984 souris seront incluses dans cette étude.

2630- Le carcinome hépato-cellulaire (CHC) est le sixième cancer le plus fréquent dans le monde. Malgré des progrès récents, l'arsenal thérapeutique reste pauvre faisant du CHC le troisième cancer le plus meurtrier à travers le globe avec une mortalité qui représente environ 85% des nouveaux cas chaque année. Identifier de nouveaux marqueurs pronostics et de nouvelles cibles pour le traitement du CHC est par conséquent un problème de santé publique de premier ordre.

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée qui reconnaît les ARN double brins d'origine virale ou endogène. L'activation de TLR3 dans les cellules normales va médier une défense anti-virale, entre autre, par la production d'interféron. Mais dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur, l'activation de TLR3 va, en plus d'une réponse inflammatoire, déclencher la mort cellulaire via l'apoptose faisant de ce récepteur une cible thérapeutique dans de nombreux cancers comme le poumon ou le sein.

Ce protocole d'expérimentation animal fait suite aux travaux initiés au laboratoire sur le CHC. In vitro, TLR3 apparaît sous exprimé voire absent dans plusieurs modèles cellulaires de CHC. Par ailleurs in vivo, les tumeurs qui se développent dans des modèles murins perdent l'expression du récepteur. Enfin nous avons analysé une cohorte de patients ayant eu une chirurgie de résection de leur tumeur, ainsi lorsque la tumeur sous-exprime TLR3, les patients présentent un moins bon pronostic avec un risque accru de récurrence précoce post-opératoire.

Le modèle animal que nous voulons utiliser est le modèle murin exprimant l'oncogène SV40 uniquement dans les cellules hépatiques. Le rationnel est de générer des souris porteuses de l'oncogène SV40 chez lesquelles TLR3 est invalidé en les croisant avec une lignée de souris invalidée pour ce récepteur afin d'évaluer si l'absence de TLR3 accélère ou augmente l'apparition des nodules cancéreux hépatiques.

L'utilisation d'un modèle murin permettra ainsi d'apporter la démonstration in vivo du rôle inédit de TLR3 comme gène suppresseur de tumeur au cours de l'hépatocarcinogénèse.

La démonstration que TLR3 a un rôle de suppresseur de tumeurs au cours de l'hépatocarcinogénèse ouvre des perspectives thérapeutiques fortes dans le traitement de ce cancer car des ligands pharmaceutiques de TLR3 sont actuellement dans des phases avancées de développement.

3- Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement

Seul un modèle in vivo pertinent peut désormais confirmer les observations in vitro et cliniques de rôle suppresseur de tumeurs de TLR3 dans les CHC or aucun modèle alternatif n'est disponible pour cela. La taille des groupes sera réduite au minimum mais sans perdre la pertinence statistique. Elle sera basée sur les résultats d'un travail pilote afin d'optimiser encore le nombre d'individus. Sur la base de ce travail pilote l'étude nécessitera au maximum 100 souris.

Les animaux seront mis à mort avant les points limites décrits habituellement dans ce modèle, les lésions sont alors microscopiques sans retentissement pour l'animal. L'analyse se fera à l'échelle histologique dans le but d'évaluer la cinétique d'apparition des tumeurs dans les groupes portant un récepteur TLR3 fonctionnel par rapport au groupe portant un TLR3 muté.

2631- Chez l'homme, les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) sont nombreuses (maladie de Crohn, recto-colite hémorragiques) et montrent une forte dérégulation de l'homéostasie immunitaire dans l'intestin. L'augmentation de l'incidence des MICI et la nature chronique et invalidante de ces maladies soulignent l'importance d'études visant à mieux comprendre les processus qui sous-tendent le développement de ces pathologies. Ici, nous proposons d'étudier les mécanismes en jeu pour le maintien de l'équilibre immunitaire intestinal à l'aide d'un modèle murin de recto-colite hémorragique.

La réponse anticorps de classe A (IgA) est une des caractéristiques principales de la réponse immunitaire muqueuse (intestin, peau, muqueuse utérine, etc) et en particulier un déterminant majeur du maintien de l'homéostasie intestinale. En particulier, la sécrétion d'IgA joue un rôle essentiel pour le maintien d'une flore commensale riche et stable et la neutralisation des agents pathogènes présents dans l'intestin. Cette réponse anticorps est principalement initiée au niveau des muqueuses et met en jeu de nombreux facteurs cellulaires et moléculaires. En particulier, les cellules dendritiques ainsi que la cytokine TGFbeta sont des acteurs majeurs de cette réponse.

Notre thématique de recherche s'articule autour de l'intégrine beta8, un récepteur capable de fixer et d'activer le TGFbeta. Les résultats récents de l'équipe et de la littérature impliquent ce récepteur dans de nombreux processus de régulation de l'homéostasie intestinale. C'est dans ce contexte que nous souhaitons étudier l'implication de l'intégrine beta8 dans les différents mécanismes de mise en place de la réponse IgA in vivo.

Nous utiliserons ici une lignée de souris génétiquement modifiée, précédemment établie dans l'équipe, qui permet l'ablation sélective de cette intégrine dans l'ensemble des cellules dendritiques de l'individu. Nous souhaitons réaliser ici une immunisation par voie orale afin de suivre la mise en place des réponses IgA spécifiques des antigènes administrés au niveau muqueux.

Cette étude permettra de disséquer l'implication de l'intégrine beta8 dans la mise en place de la réponse IgA ainsi que l'implication relative des différents acteurs cellulaires (cellules dendritiques, lymphocytes T). Plus généralement, cette étude vise à dégager les mécanismes fondamentaux de l'homéostasie intestinale afin de mieux comprendre sa dérégulation dans les MICI.

Comme la complexité de l'environnement tissulaire et le réseau complexe de cellules immunitaires impliquées dans ces mécanismes ne peuvent pas être reproduits entièrement in vitro, cette étude nécessite la réalisation d'expériences à l'échelle de l'animal. De plus, nous conduisons en parallèle un certain nombre de tests in vitro afin de réduire notre dépendance aux modèles animaux.

La procédure expérimentale d'immunisation orale décrite ci-dessous n'entraîne pas de souffrance particulière pour les animaux. Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de permettre une interprétation statistique des résultats, soit 60 animaux au total.

2632- Le cancer du poumon, selon l'OMS, est la cause la plus fréquente de décès chez l'homme et après le cancer du sein chez la femme. Il est la cause de 1,3 million de décès par an dans le monde.

Le cancer du colon a la fréquence la plus élevée en France, on découvre 33 000 nouveaux cas par an et 16000 personnes en meurent.

Des études in vitro, ont permis de mettre en évidence des molécules candidates pour une thérapie ciblée, dont l'enjeu est un traitement plus efficace chez les patients avec des effets secondaires réduits. Parmi ces molécules, figurent des couples ligands/récepteurs. D'une façon générale, les couples ligands/récepteurs sont actifs que si le ligand interagit avec son récepteur. Mais, il existe des couples ligands/récepteurs dont le récepteur est actif même en absence de son ligand, dans cette configuration son activité entraîne une mort des cellules. Des outils ont été développés pour piéger le ligand afin que le récepteur induise la mort cellulaire.

Depuis quelques années, il a été montré l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC) au sein des tumeurs. Les CSC donnent naissance à des cellules qui prolifèrent et qui peuvent engendrer des métastases.

Le but de ces travaux, à partir de lignées cellulaires obtenues à partir de cancer humain de poumon et de colon, est d'étudier l'effet d'une molécule candidate au niveau des CSC dans un environnement tumoral. Après traitement in vitro des CSC, en présence ou non de fibroblastes associés au cancer (CAF), avec la molécule candidate, les cellules seront implantées chez la souris et la prise ou non tumorale sera suivie.

Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée contribuent au bien être animal. Cette étude sera réalisée avec un nombre d'animaux réduit au maximum, elle ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes alternatives.

Le nombre total de souris est de 500.

2633- Parmi les enjeux sociétaux actuels majeurs figurent l'urgence de comprendre les mécanismes qui sous-tendent le développement des maladies métaboliques type obésité. Cela donne lieu au développement de nouvelles drogues ou dispositifs tels encore dernièrement cette pilule qui une fois ingérée, se gonflerait dans l'estomac et donc renforcerait le signal de satiété. Si on peut être sceptique quant aux réels effets de ce type de stratégie, des avancées majeures ont en revanche été réalisées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'apparition des désordres métaboliques, en particulier au niveau des réseaux neuronaux impliqués dans le contrôle de la faim.

Des travaux récents conduits chez un prosimien ont permis de mettre en avant des caractéristiques intéressantes de la régulation du métabolisme. Les résultats de cette étude ont confirmé qu'une grande part des variations saisonnières observées chez cette espèce se produit pendant l'hiver. En particulier, on distingue une phase nette d'engraissement dans la première moitié de l'hiver et cette tendance s'inverse spontanément, sans qu'aucun paramètre de l'environnement ne soit modifié. La phase d'engraissement est notamment caractérisée par une très forte efficacité alimentaire, une activité métabolique limitée et une tendance à constituer des réserves graisseuses. En contraste, la phase de dégraissage est caractérisée par le développement d'une intolérance au glucose associée à des niveaux de base en insuline plus élevés. Il y a donc séparation des phases obésogène et diabétogène dans la saisonnalité de ce prosimien, ce qui est relativement paradoxal vis-à-vis des modèles classiques d'obésité. Fait intéressant, cette espèce est capable d'inverser spontanément ces deux phénotypes, sans jamais que le seuil pathologique ne soit atteint. L'ensemble de ces résultats prometteurs confirme l'opportunité unique d'explorer les mécanismes qui sous-tendent la capacité de ce prosimien à inverser spontanément le processus d'engraissement, et souligne l'importance de poursuivre cette étude.

Pour cela nous prévoyons de caractériser les signatures transcriptomiques et protéomiques de tissus fortement impliqués dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique, i.e. le foie, le muscle et le tissu adipeux blanc, en réalisant des biopsies au début et à la fin de l'hiver chez des animaux mâles et femelles adultes; les mêmes prélèvements seront réalisés chez des animaux âgés pour tester les effets du vieillissement sur les paramètres mesurés.

Afin de répondre à l'exigence de réduction du nombre d'animaux mais assurer tout de même un pouvoir statistique suffisant pour les effets attendus, ces biopsies seront réalisées sur un nombre maximal de 6 animaux par groupe expérimental (saison, sexe, âge), ce qui fait un total de 48 animaux pour l'ensemble du projet. Le but de cette étude étant de caractériser au plan moléculaire les modifications physiologiques spontanées qui apparaissent au cours de l'hiver, une grande attention sera apportée pour préserver au maximum l'animal dans ses conditions habituelles d'hébergement en essayant d'être le moins intrusif possible. L'indicateur privilégié pour le suivi du bon rétablissement de l'animal après application de la procédure expérimentale sera les variations anormales de masse corporelle. Dans le contexte saisonnier, les variations de poids peuvent aller jusqu'à 10% de variation en une semaine. Une perte de poids sera considérée comme pathologique à partir du moment où ce seuil sera dépassé. Ce critère sera pris en compte avec d'autres critères comme la prostration, l'état de forme général de l'animal (réactivité, agressivité, etc).

Enfin, un maximum d'attention sera également apporté à la maîtrise des techniques utilisées afin de limiter au maximum le stress et la douleur chez les animaux expérimentés.

2634- Les emballages alimentaires et pharmaceutiques à base de plastiques contiennent de nombreux additifs essentiels à leurs propriétés physico-chimiques. Au cours du vieillissement de ces emballages, ces additifs peuvent contaminer leur contenu alimentaire et être absorbés par l'individu. Neuf de ces additifs ont un intérêt particulier en santé humaine puisque

des quantités non négligeables ont été retrouvées dans les urines et le sang de la population générale. De plus, de par leur structure, ces composés sont susceptibles de se comporter comme des perturbateurs endocriniens connus pour modifier les équilibres physiologiques dont les dérèglements sont associés à des syndromes métaboliques augmentant le risque de développement de cancers. Le but de ce projet sera donc d'évaluer les conséquences d'une exposition chronique à ces produits, d'une part d'un point de vue métabolique, mais également via l'analyse des événements oncogéniques associés au développement de ces syndromes.

Ce programme se déclinera en trois phases :

Expérimentation 1: Détermination des doses analytiquement détectables dans le sang (exposition aiguë) après administration intrapéritonéale.

Expérimentation 2: Mesure des paramètres métaboliques, biochimiques et de tolérance au cours d'une exposition chronique (ajout du composé à l'eau de boisson). Le niveau d'exposition sera fonction de la concentration minimale analytiquement détectable et tolérable par la souris et suivant les caractéristiques physicochimiques des différents plastiques. Cette dose, sera pondérée par un facteur 1/10, 1/100.

Expérimentation 3: Détermination de la toxicocinétique des plastiques à la dose maximale tolérable par administration intrapéritonéale et par gavage lors des expérimentations 1 et 2. Nous déterminerons la distribution tissulaire des composés et de leurs métabolites éventuels préalablement caractérisés in vitro. L'identification et la quantification sera réalisée en utilisant une méthode analytique par LC- MS/MS.

Nous allons respecter la règle des 3R; Réduction du nombre d'animaux utilisés en réalisant la procédure 1 en deux temps. D'abord, une expérience avec les deux plus faibles doses et ensuite une autre expérience avec les fortes doses pour les plastiques non détectables dans l'expérience 1. Les méthodes alternatives, quand elles existent seront utilisées (détermination des métabolites des plastiques sur cellules modèles cellulaires). Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal.

Le nombre d'animaux est de 680 souris.

2635- La peau forme la couche externe protectrice du corps, et est composée de deux compartiments, le derme et l'épiderme étroitement liés par la présence d'une membrane basale. Le derme est composé de plusieurs types cellulaires, dont les fibroblastes et de divers composants de la matrice extracellulaire, tel que le collagène. L'épiderme, qui lui constitue la couche la plus externe est principalement composé de cellules épithéliales, les kératinocytes, qui se maintiennent et se renouvèlent tout au long de la vie. Au cours du vieillissement cutané, le renouvellement cellulaire se ralentit et l'environnement de l'épiderme est altéré. Le derme sous-jacent se modifie et n'assure plus son rôle de soutien pour l'épiderme. Cependant, les mécanismes moléculaires qui régissent le vieillissement sont méconnus et peu étudiés.

Ce projet a pour but d'étudier le rôle de CD98hc dans les différents compartiments cutanés, le derme, l'épiderme et les cellules souches au cours du vieillissement.

La protéine d'intérêt du laboratoire, CD98hc, est une protéine à double fonction. Elle est exprimée à la fois dans le derme et dans l'épiderme. Elle interagit à la fois avec des récepteurs de l'adhérence cellulaire permettant d'intégrer les signaux de l'environnement matriciel et avec des transporteurs d'acides aminés jouant ainsi un rôle dans le métabolisme. Elle représente un lien unique entre l'adhésion à la matrice extracellulaire et le transport des acides aminés. Nous avons montré lors d'une étude préalable que l'expression de CD98hc s'éteint avec l'âge dans l'épiderme.

L'hypothèse de travail sur laquelle repose notre projet est que la capacité de CD98hc à réguler la signalisation intégrinique et le transport d'acides aminés joue un rôle crucial dans le vieillissement cutané.

Afin de tester cette hypothèse nous utiliserons différentes lignées transgéniques, où la suppression de notre gène d'intérêt s'effectue grâce à la Cre recombinase. Cette Cre recombinase s'exprime dans des compartiments spécifiques comme l'épiderme, le derme ou le compartiment des cellules souches épidermiques. De plus, l'expression de cette Cre peut être contrôlée dans le temps car elle est inductible par ajout d'agents exogènes. Cette stratégie représente un design expérimental unique permettant de déterminer la contribution relative de CD98hc à la fonction de chacun des compartiments cutanés au cours du vieillissement. Au cours de ce processus, nous anticipons l'apparition de phénotypes dommageables tels que la formation de prolapsus, la perte de poil et des retards de cicatrisation dans des cas de contacts inter-animaux au sein de la cage.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir d'un nombre minimum d'animaux. Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins car les animaux transgéniques sont facilement disponibles et sont les plus couramment utilisés en laboratoire. Aussi souvent que possible, les expériences seront réalisées in vitro sur des cellules en culture. Cependant, la complexité de la peau et des mécanismes de vieillissement, de part la présence de nombreux types cellulaires d'origine embryonnaire différente, nécessite la reconstitution d'un environnement complet, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées dans le respect de la réglementation européenne afin de réduire au minimum 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 1160.

2636- Ce projet vise à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le processus de régénération musculaire à la suite d'une blessure du muscle squelettique (tibialis anterior (TLA)). Ceci afin de 1) Caractériser l'implication de la voie PPAR β / δ dans les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de régénération musculaire; 2) Caractériser l'implication des cellules T régulatrices dans ces effets et notamment dans le dialogue avec les cellules satellites; 3) Evaluer les effets sur le

délai de récupération de paramètres fonctionnels et métaboliques (endurance, force musculaire). L'activation pharmacologique de cette voie, conduit en un remodelage rapide oxydatif du muscle tibialis, une angiogenèse et une hyperplasie correspondant à la génération de 600 nouvelles myofibrilles. Outre ses effets métaboliques connus, PPAR β/δ apparaît comme un régulateur alternatif de l'inflammation et du stress oxydant, affectant le profil des macrophages. Son niveau d'expression et donc son activité transcriptionnelle est régulée par le niveau d'activation des voies du stress impliquées dans la réponse inflammatoire.

Nous pensons que le délai et la qualité de la régénération musculaire pourrait être améliorée par une activation pharmacologique de la voie PPAR β/δ . Nous mènerons un protocole expérimental, classiquement utilisé chez la souris, de myonécrose induite dans le TLA par injection de cardiotoxine pour stimuler la régénération du muscle. Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant l'étude de la régénération du muscle. 120 animaux sont nécessaires. Nous traiterons une partie des souris par l'agoniste spécifique de PPAR β/δ (GW0742) par voie orale (supplémentation de l'alimentation) et investiguerons les effets à différents temps/étapes du processus de régénération. De plus, nous évaluerons les capacités physiques (tests de force (agrippement) et d'endurance (tapis roulant)). Pour satisfaire au principe de réduction, nous avons inclus un seul groupe non blessé, mais traité oralement au GW0742 et utiliserons le muscle de la patte non endommagée comme contrôle (injection de solution saline). Pour satisfaire au principe de raffinement, l'injection intra-musculaire de Cardiotoxine sera réalisée sous anesthésie gazeuse (inhalation de vetflurane). De plus, nous apporterons une attention particulière à chacun des animaux lors des 2 premiers jours suivant l'injection: les animaux seront observés et le poids des animaux et la prise alimentaire seront mesurés. Dans 99% des cas, les animaux récupèrent très vite mais si l'état se dégradait pour l'un d'entre eux, il serait immédiatement euthanasié par dislocation cervicale.

2637- L'infection à *M. ulcerans*, ou ulcère de Buruli, est une maladie négligée émergente. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions débutent généralement par un nodule qui évolue en une ulcération que s'étend dramatiquement. La destruction tissulaire est due à l'action d'une toxine, la mycolactone. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Le caractère indolore des lésions est provoqué par la mycolactone. En effet récemment, nous avons démontré que la mycolactone présentait un pouvoir analgésique en hyperpolarisant les neurones limitant alors la transmission de l'information nerveuse. Dans ce contexte, l'objectif global de notre projet est d'identifier de nouvelles molécules aux propriétés analgésiques. Ce projet se justifie puisque l'arsenal thérapeutique contre la douleur reste limité. Plus précisément, nous allons évaluer les propriétés analgésiques des composés lactones. Au préalable, il aura été démontré sur des lignées cellulaires que les composés à évaluer sont capables d'hyperpolariser les cellules. A termes, ce travail doit aboutir à la mise au point de nouveaux analgésiques puissants.

Par nos approches *in vitro*, nous avons d'ores et déjà identifié 8 composés lactones capables d'hyperpolariser les cellules sans effet cytotoxiques. Sur les cinq ans de notre projet nous estimons à 40 composés et dérivés à évaluer. Ainsi, le nombre nécessaire d'animaux pour cette étude est estimé à 1869 souris. Ce nombre est suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs tout en respectant la règle des 3R, à savoir la réduction au minimum du nombre d'animaux, le raffinement des résultats, sans pouvoir nous affranchir de l'utilisation d'animaux vivants. De plus toutes les mesures seront prises pour limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse provoquée aux animaux.

2638- La toxoplasmose est une zoonose due à un parasite protozoaire *Toxoplasma gondii* fréquente en France puisque plus de 50% de la population la contracte au cours de leur vie le plus souvent sans signes cliniques. La toxoplasmose congénitale est secondaire au passage trans-placentaire du parasite lorsqu'une femme enceinte non immunisée contracte l'infection en cours de grossesse. Le risque de transmission materno-fœtale augmente avec l'âge de la grossesse lors de la contamination maternelle ; le taux global de transmission est de l'ordre de 29%. La sévérité de la maladie évolue de façon inverse (formes graves en cas de transmission en début de grossesse, formes infra-cliniques en fin de grossesse). Le potentiel évolutif de la maladie est imprévisible, surtout lié à la survenue de chorioretinites tardives.

La France a instauré un programme de prévention de la toxoplasmose régi par le décret du 14 février 1992, relatif au dépistage obligatoire et à la surveillance des femmes enceintes avant la fin du premier trimestre et jusqu'à la fin de la grossesse. Une circulaire du 27 septembre 1983 adjoint la prescription de règles hygiéno-diététiques pour les femmes enceintes et chez les immunodéprimés non immunisés vis-à-vis de la toxoplasmose.

L'évolution de la toxoplasmose congénitale est variable, allant de l'avortement spontané à des formes généralisées ou neurologiques sévères jusqu'à des formes infra cliniques (asymptomatiques). Bien que la toxoplasmose ne soit pas une infection à caractère épidémique, la toxoplasmose congénitale est considérée en France comme un important problème de santé publique du fait des séquelles cliniques potentiellement sévères (neurologiques ou ophtalmologiques) chez les enfants infectés notamment en l'absence de diagnostic et de traitement appropriés. Aucun système de surveillance de la toxoplasmose congénitale n'existe à l'heure actuelle en France.

Les études de prévalence rapportées dans les années 1960 ont révélé des taux de séroprévalence élevés comparés aux autres pays européens. La France a mis en place un important programme national de prévention de la toxoplasmose congénitale dès 1978. Ce programme de prévention a été instauré sans mise en place complémentaire d'un système de surveillance de la toxoplasmose congénitale qui est un indicateur majeur pour évaluer l'efficacité de ce programme.

Le Centre National de Référence de la toxoplasmose, en collaboration avec l'Institut de Veille Sanitaire a mis en place un système de surveillance basé sur la notification des cas de toxoplasmose congénitale. Ce système de surveillance permettra pour la première fois d'effectuer un recueil systématique et continu des cas de toxoplasmose congénitale. Ce système pourra

ainsi contribuer à préciser et évaluer le rôle du programme national de dépistage mis en place en France, dans l'épidémiologie de cette infection.

La mise en place de ce système de surveillance pour la toxoplasmose congénitale en France permettra de :

- Estimer l'incidence de la toxoplasmose congénitale en France.
- Déterminer le nombre de cas de toxoplasmoses congénitales sévères au moment du diagnostic.
- Suivre la tendance de la maladie (nombre de cas et caractéristiques des cas).
- Faire des comparaisons entre l'incidence de la maladie observée en France et dans d'autres pays Européens.

Les cas faisant l'objet du programme de surveillance sont issus de la population composée des foetus vivants, en cours de développement, produits d'avortement (fausse couche ou IMG/IVG, nouveau-nés, nourrissons jusqu'à 12 mois dont la mère a présenté une infection toxoplasmique en cours de grossesse ou dans les semaines précédant la grossesse.

Un cas de toxoplasmose congénitale est défini comme un sujet : faisant partie de la population ciblée dont l'infection a été détectée en France (y compris les DOM) et dont le diagnostic d'infection toxoplasmique a été confirmé par au moins un des critères suivants :

1. Détection de *T. gondii* dans les tissus (placenta, produits d'expulsion) ou un liquide biologique (liquide amniotique, LCR, sang du cordon ou du nouveau-né ou liquide d'ascite) par PCR, inoculation à la souris ou culture cellulaire (difficile en raison de la toxicité de l'inoculum initial)

NB : Pour la détection sur le placenta, la confirmation du diagnostic doit être impérativement apportée par un autre critère biologique (parasitologique ou immunologique)

et/ou

2. Réponse immunitaire spécifique contre la toxoplasmose :

- présence d'anticorps spécifiques IgM ou IgA pendant la première semaine de vie
- ou présence d'une néosynthèse d'anticorps IgG ou IgM ou d'IgA (par technique Western blot ou ELIFA)
- ou augmentation des anticorps IgG spécifiques sur des prélèvements successifs au-delà du premier mois de vie
- ou persistance des anticorps IgG spécifiques à l'âge de 12 mois

Une moyenne de 15 toxoplasmoses congénitales est déclarée par an. Pour chaque diagnostic, un maximum de 8 souris par couple maman/bébé (3 pour le liquide amniotique, 3 pour le placenta et 2 pour le sang de cordon) est utilisée, soit 120 souris / an maximum (600 souris pour 5 ans).

La recherche du parasite dans le liquide amniotique permet de prouver précocement, en cas de positivité, l'infection fœtale et de mettre en route un traitement curatif in utero.

La recherche du parasite dans le placenta et dans le sang de cordon fait habituellement partie du diagnostic néo-natal de la toxoplasmose congénitale. Il s'agit d'une analyse :

- complémentaire à la recherche d'anticorps (incluant le Western blot) chez le nouveau-né, chez qui les analyses sérologiques sont indispensables,
- particulièrement indiquée en l'absence de diagnostic prénatal ou si celui-ci est négatif,
- ayant également un intérêt épidémiologique, en permettant l'isolement de souches de *T. gondii* et leur conservation pour étude physiopathologique et épidémiologique.

Les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoir ventilés, avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois toutes les 2 semaines. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute.

2639- La respiration est une fonction indispensable pour la survie. Des défauts de respiration sont fréquents, par exemple chez les patients atteints d'apnées de sommeil ou chez des nouveau-nés immatures, également, mais plus rarement, chez des patients atteints de maladies génétiques. Notre compréhension du contrôle de la respiration a progressé au cours des dernières années, mais elle est encore très incomplète. Nous appliquons les approches de génétique de souris pour disséquer les circuits nerveux contrôlant la respiration chez les mammifères. Au cours des dernières années, nous avons montré le rôle crucial dans la régulation de la respiration d'un groupe de neurones dans le cerveau postérieur. Le but du présent projet est d'analyser un deuxième groupe de neurones de fonction encore inconnue dont un faisceau d'arguments suggère qu'ils sont également impliqués dans le contrôle de la respiration. Il s'agit d'un projet collaboratif entre des biologistes du développement et des physiologistes qui appliqueront les mesures physiologiques de la respiration et les technologies modernes d'imagerie fonctionnelle. L'utilisation de souris génétiquement altérées leur permettra de cibler spécifiquement des groupes de neurones prédéterminés. Le présent projet porte sur la partie réalisée par l'équipe de biologie du développement. Elle consiste dans la validation des outils génétiques utilisés par des techniques histologiques. Un deuxième volet du projet de biologie du développement concerne l'évolution du contrôle respiratoire en recherchant des groupes de neurones apparentés à ceux mis en évidence chez les mammifères chez un animal aquatique, le poisson-zèbre.

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

Réduction : Nous réduisons le nombre de souris au strict minimum requis pour obtenir des résultats représentatifs. De plus, nous limitons le nombre de souris utilisés par deux manières : a) Nous travaillons principalement sur l'embryon ; dans ce cas, on peut obtenir plusieurs animaux du génotype souhaité par femelle gestante, et les génotypes utilisés comme contrôles seront présents dans les mêmes portées. b) Nous travaillons sur des coupes de tissu permettant d'effectuer plusieurs analyses histologiques sur le même matériel. De même, les études histologiques des poissons-zèbre se feront sur coupes. Nous prévoyons d'utiliser 125 souris et 50 poissons pour la partie histologique qui concerne cette demande.

Raffinement : Nous travaillons principalement sur des mutations conditionnelles qui présentent un phénotype uniquement après croisement avec une lignée apportant une recombinaison donc chez l'embryon. Tous les prélèvements seront fait post-mortem, soit après euthanasie par une méthode réglementaire, soit après overdose d'anesthésique. Nos procédures n'impliquent aucune douleur ou dommage durable que pourraient ressentir les animaux.

Remplacement : Un mécanisme physiologique complexe comme la respiration peut être étudié uniquement en utilisant d'animaux vivants.

2640- Quatre vingt dix pourcent des patients atteints de cancer décèdent de leurs métastases. L'invasion des cellules tumorales dans le microenvironnement local est la première étape de la cascade métastatique et, à ce titre, une cible thérapeutique stratégique. Les cancers colorectaux (CRC) représentent la deuxième cause de mortalité liée au cancer et le péritoine est le deuxième site métastatique chez ces patients (carcinose péritonéale (CP)).

Notre laboratoire a identifié à partir d'épanchements de patients atteints de CP que les cellules tumorales se disséminaient sous forme de cellules indépendantes ou de larges sphères tumorales (ST). Ces dernières peuvent regrouper plusieurs centaines de cellules cohésives, celles-ci étant prédominantes.

L'objectif de cette étude est de caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'invasion du péritoine par les cellules indépendantes et les ST ainsi que de comparer leur potentiel métastatique.

Nous modéliserons le matériel tumoral retrouvé dans les effusions de patients en utilisant des modèles complémentaires : lignée cellulaire cultivée in vitro et des organoïdes (petits fragments de tumeurs de patients ou de lignées cellulaires greffées sur souris immunodéprimées à partir desquels les ST seront produites). A partir de différents modèles d'organoïdes, nous préparerons des cellules indépendantes ou des ST et étudierons leurs propriétés invasives par deux approches indépendantes:

1) nous étudierons les molécules impliquées dans cette invasion, in vitro dans des gels tridimensionnels (3D) de collagène en inhibant ou activant des protéines pour déterminer leurs implications dans ce processus.

2) nous évaluerons leurs potentiels métastatiques in vivo par injection intra-péritonéales de ST et de cellules indépendantes dans des souris immunodéprimées. Ceci permettra de mettre les ST dans des conditions proches de celles retrouvées chez le patient.

Pour modéliser les ST, il est important de se rapprocher au plus près de la réalité biologique. Les modélisations préalablement réalisées à partir de lignées cellulaires n'ont pas permis d'obtenir des structures équivalentes, d'un point de vue organisation et comportement invasif, à celles retrouvées chez les patients. Pour cette raison, nous recourrons à des tumeurs greffées sur souris à partir desquelles nous modéliserons les ST.

Cette étude nécessitera donc des souris pour amplifier les modèles de tumeurs qui nous permettront de générer les ST pour les études en gel 3D. Aussi, elles permettront de réaliser des injections intra péritonéales pour comparer le pouvoir métastatique selon les modèles de ST et par rapport aux cellules indépendantes ainsi que le suivi du développement métastatique via de l'imagerie intra-vitale. Le développement de ces méthodes s'inscrit pleinement dans la mise en place de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux, puisque une grande partie des expériences seront faites sur des explants ex vivo (ST) et par des tests d'invasion in vitro (gel 3D collagène). Ceci permettra, entre autres, d'utiliser moins d'animaux, pour effectuer des panels de tests et de caractérisation très importants.

Pour modéliser les ST, il est important d'être au plus près de la réalité biologique : seules les ST réalisées à partir de tumeurs sur souris ont permis de mimer les ST retrouvées chez les patients, ce qui rend indispensable l'utilisation d'animaux pour notre étude.

Le bien-être des souris sera respecté en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. A partir d'une tumeur, issue d'une souris, différents tests (chimiothérapie et à des concentrations différentes, etc) pourront être réalisés in vitro réduisant ainsi l'utilisation d'animaux. De plus, une planification statistique a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude. De même que la greffe de tumeur sur les deux flancs d'une même souris ou l'utilisation d'une même souris pour les différents types d'analyses. L'ensemble des expériences s'appuie également sur des études bibliographiques reconnues et sur notre expertise au sein du laboratoire.

Le nombre nécessaire total de souris pour ce projet est de 906.

2641- La polykystose rénale autosomique dominante (PKD) est la maladie héréditaire monogénique la plus fréquente chez l'homme avec une prévalence de 1/1000. La PKD est provoquée par la mutation des gènes PKD1 ou PKD2 codant pour les polycystines PC1 et PC2. Cette pathologie multisystémique est caractérisée par l'apparition lente et progressive de kystes qui surviennent tandis que la détection du flux par les cellules épithéliales ciliées des néphrons et principalement des tubules collecteurs est altérée. Les kystes créent des tensions mécaniques sur les néphrons sains, entraînant à leur tour leur altération (dédifférenciation des cellules épithéliales). Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la PKD demeurent cependant mal compris. Le modèle de ligature de l'uretère est le seul qui permette de recréer ce stress mécanique dans la médullaire interne du rein par accumulation de l'urine.

Une analyse protéomique par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier plusieurs protéines interagissant avec PC2. En particulier, nous avons identifié une protéine du réticulum endoplasmique de fonction encore inconnue (TMEM33). En utilisant une lignée cellulaire de tubules rénaux, nous avons montré que la surexpression de TMEM33 réduit la résistance des cellules à l'apoptose induite par la thapsigargine. A l'inverse, son invalidation par des siRNA les protège de la mort cellulaire.

Afin d'établir l'implication de TMEM33 dans la PKD, nous devons définir tout d'abord le rôle rénal de Tmem33. Un modèle de souris déficientes en Tmem33 a été généré et la fonction rénale de ces animaux sera explorée. L'application de la règle des 3R

(Réduction, Remplacement et Raffinement) est appliquée dans la démarche expérimentale de ce projet car nous utilisons le nombre de souris minimal strictement nécessaire à établir la fonction rénale de ces animaux. Ces animaux sont élevés par un fournisseur agréé. Lors de l'arrivée à l'animalerie, les animaux sont hébergés en cages ventilées individuellement avec nourriture et eau ad libitum (Abreuvement automatique pour l'eau qui est ainsi toujours fraîche) et une stratégie d'hébergement permet de limiter l'angoisse et le stress imposé aux animaux. Les souris sont 5 par cage dans des bacs de type IIL (325 X 170 mm et X 140 mm de hauteur). Plusieurs enrichissements sont à disposition des animaux: pipette de l'abreuvement automatique, nids végétaux et tunnels en carton ou maison/igloo en plastique. Les animaux sont hébergés dans des conditions d'hygrométrie et de température adaptées à l'espèce. Une alternance jour/nuit (7h/19h) est en place. Ces conditions sont surveillées en permanence par logiciel via des capteurs de mesure. Lors du protocole expérimentale, nous explorerons 32 souris males pour les 24 mois du projet dont 32 (16 WT et 16 Tmem33-/-) pour la procédure expérimentale. Deux séries expérimentales sont prévues dans ce projet. La 2nd série expérimentale permettra de confirmer les observations faites dans la première série. Ces animaux sont également réutilisés pour des prélèvements terminaux de plasma et d'organes pour nous permettre de faire des études biochimiques sur leurs reins. Nous n'avons pas d'autres alternatives que d'étudier des souris génétiquement modifiées car il n'existe pas de modèle cellulaire satisfaisant permettant d'évaluer la fonction rénale. Nous aurons plusieurs recours pour prévenir ou remédier à la souffrance : 1-Arrêt et sortie du protocole pour l'animal en souffrance et mise en période de récupération d'au moins deux semaines. 2-Anesthésie profonde lors des prélèvements ou perfusion d'organes. 3- Mise à mort de l'animal par dislocation cervicale, si le degré de souffrance le justifie. Cette étude permettra d'appréhender les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la pathogenèse des kystes associés à la PKD. Le bénéfice escompté sera une meilleure connaissance de la maladie génétique rénale la plus fréquente chez l'homme et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

2642- Au cours de l'obésité, une inflammation systémique de bas grade se développe, contribuant à l'installation d'une résistance à l'insuline et à un risque accru de maladies cardiovasculaires. L'intestin, en laissant passer des endotoxines bactériennes contribuerait au développement de l'inflammation et des maladies métaboliques associées. Chez l'Homme sain un seul repas riche en lipides provoque une élévation transitoire de l'endotoxémie et de marqueurs inflammatoires. Nous faisons l'hypothèse que la répétition des apports en lipides contribuerait à l'installation d'une inflammation bas grade. Chez l'Homme obèse il existe une inflammation intestinale associée à des dysfonctionnements de la fonction des cellules intestinales. Cependant les mécanismes mis jeu lors de l'apparition de cette inflammation intestinale restent inconnu. Notre objectif est de comprendre comment se met en place l'inflammation intestinale chez l'Homme, pour cela nous voulons établir un modèle murin d'inflammation intestinale en réponse aux lipides et étudier la modulation de la mise en place de cette inflammation sous l'action d'acteurs connus comme étant pro-ou anti-inflammatoires comme AHR, FXR et SR-B1 ou l'effet de probiotiques. les protocoles mis en œuvre utiliseront 260 souris au total. Ils s'agit en grande majorité de souris C57BL/6 issus de l'élevage et d'un modèle transgénique d'inactivation intestinale de SR-B1. Les expériences sont conçues de façon à comparer le plus possible les conditions entre elles afin de limiter le nombre d'animaux contrôles à utiliser. Le bien-être des animaux est suivi quotidiennement par les expérimentateurs. Des points limites ont été définis. Le raffinement réside dans le fait de concevoir les expériences en limitant au maximum l'utilisation de groupes contrôles surnuméraires. Les animaux sont élevés dans notre nouveau centre d'explorations fonctionnelles. le nombre d'animaux par cage est limité, et chaque cage contient des objets d'enrichissements (coton et objet permettant l'escalade et la cache). L'ensemble de ce projet nous permettra de caractériser l'inflammation intestinale postprandiale et son importance au cours du développement de maladies métaboliques. Il permettra de mieux comprendre le rôle des fonctions intestinales dans l'apparition des maladies métaboliques et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

2643- Les fonctions cognitives sont générées par le traitement de l'information dans le cortex cérébral. Les circuits corticaux sont constitués de différents types de neurones reliés entre eux par un très grand nombre de connexions qui sont responsables de la propagation de l'information. Les neurones peuvent transmettre une excitation (entraînant l'activation d'un autre neurone) ou inhiber un autre neurone. Le résultat est la création de réseaux fonctionnels complexes, qui produisent des rythmes électriques, sous-tendant les mécanismes de la cognition.

Dans ce contexte, une balance précise entre excitation et inhibition est fondamentale pour le bon fonctionnement du cerveau. Des maladies neurologiques et psychiatriques très graves peuvent se développer lorsque cet équilibre est modifié.

Parmi tous les types cellulaires du cortex cérébral, les neurones corticaux inhibiteurs (également connus sous le nom d'interneurones, qui utilisent le neurotransmetteur GABA) sont très hétérogènes et peuvent être classés selon des critères anatomiques et électrophysiologiques précis.

Notre équipe étudie comment les neurones du cortex cérébral se connectent les uns aux autres, et comment ces connexions synaptiques contribuent à la genèse de différentes formes d'oscillations du réseau neuronal

Notre travail permettra une meilleure compréhension de la régulation de l'excitabilité des interneurones et leur rôle au sein des réseaux du cortex cérébral.

L'espèce utilisée sera la souris. Pendant la durée du projet (5 ans) un total de 3 520 souris seront utilisées. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées.

2644- La fibrose rénale est un processus pathologique altérant la fonction rénale, qui aboutit au développement de l'insuffisance rénale chronique (IRC). L'IRC touche plus de 2,5 millions de personnes en France et le taux de personnes atteintes augmente de 7 à 8% par an. De nos jours, il n'existe pas de thérapie et les seuls recours sont la dialyse ou la transplantation rénale.

En France, environ 3000 reins sont greffés chaque année et le nombre de patients en attente d'une greffe ne cesse d'augmenter. L'une des stratégies pour diminuer ce nombre est d'augmenter le taux de survie des greffons qui est étroitement lié aux lésions subies par le rein au moment même de la transplantation.

Notre laboratoire a démontré l'importance de différentes protéines dans la maladie rénale dont le récepteur à domaine discoïdine de type 1 (DDR1).

Ce projet est une étude pré-clinique dont l'objectif est de tester l'efficacité de composés dirigés contre DDR1 à différentes doses dans un modèle expérimental mimant les lésions subies par le greffon pendant la transplantation chez la souris.

Nous avons au préalable effectué de nombreux tests *in vitro* afin de diminuer au maximum les composés candidats et de sélectionner les plus spécifiques. Ces travaux nous ont permis de réduire le nombre estimé d'animaux pour ce projet sur une année à 160 souris.

Les animaux recevant le placebo seront atteints d'une pathologie rénale aiguë associée à différents symptômes. Cependant, grâce à l'expérience de notre unité dans ce type de pathologie et dans un souci de respect du bien-être des animaux, nous avons prévu de mettre en place des critères d'interruption des procédures expérimentales basés sur des paramètres mesurables non-invasifs tels que la variation du poids corporel ou encore la surveillance du comportement des souris. Nous prévoyons également des injections de produits analgésiques afin de diminuer au maximum les douleurs. Ainsi, nous pourrons éviter des souffrances non nécessaires aux animaux.

Si les résultats de cette étude pré-clinique s'avèrent positifs, il sera alors possible d'envisager la création d'un nouveau médicament permettant d'augmenter le taux de survie des greffons chez l'Homme.

2645- Le cancer du sein est une maladie fréquente, atteignant environ une femme sur huit. Les données épidémiologiques ont montré une forte corrélation entre l'obésité et l'augmentation du risque de cancer. Jusqu'à présent peu d'attention a été portée au tissu adipeux adjacent, bien que des données récentes suggèrent que les adipocytes sous l'influence des cellules tumorales, peuvent contribuer à différentes étapes de la carcinogenèse.

Nous nous proposons donc d'étudier sur la souris les conséquences de l'obésité induite par régime sur la progression tumorale par greffes orthotopiques de cellules tumorales mammaires humaines.

Type d'animaux : Souris Swiss nu/nu

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 120 souris expérimentales pour une durée maximale de 5ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

2646- L'œdème maculaire est une cause majeure de déficience visuelle qui intervient au cours de nombreuses pathologies rétiniennes : rétinopathie diabétique (RD), dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), inflammations intraoculaires (uvéites) ou occlusions veineuses. De forte dose de glucocorticoïdes sont utilisées en injection intra-oculaire pour traiter l'œdème d'origine non seulement inflammatoire (uvéites) mais aussi vasculaire (occlusions veineuses) avec un effet relativement court accompagné parfois d'effets secondaires sévères (glaucome, cataracte). Les anti-VEGF neutralisant le facteur de croissance VEGF sont utilisés pour traiter la forme néovasculaire de la DMLA, ils ont un effet démontré sur l'exsudation, mais peu d'effets sur les néovaisseaux et avec comme principal inconvénient la nécessité de réinjection intraoculaire mensuelle, exposant à un risque d'infection endoculaire.

L'œdème rétinien est la conséquence de la perturbation de l'homéostasie hydro-ionique de la rétine (rupture des barrières hémato-rétiniennes et/ou dérégulation des mécanismes de drainage des fluides via cellules gliales de Müller (CGM), épithélium pigmentaire et choroïde). Les mécanismes moléculaires qui contrôlent les mouvements hydro-ioniques dans la rétine restent mal connus.

Le récepteur minéralocorticoïde (MR) est exprimé non seulement dans le rein où il est impliqué dans la régulation des canaux/pompes ioniques contribuant à la réabsorption du sodium et le maintien de la pression artérielle, mais aussi dans le cœur, les vaisseaux, les tissus adipeux etc. Une activation chronique excessive du MR a été liée à l'inflammation, le stress oxydant et la prolifération fibreuse en pathologies cardio-vasculaires et rénales. Le MR est aussi exprimé dans la rétine. Nous

avons montré chez le rat que son activation induit un œdème de la rétine et une dilatation et perméabilisation des vaisseaux choroidiens via activation et modification de localisation des canaux ioniques dans les CGM et les cellules endothéliales vasculaires. Notre hypothèse est qu'une activation excessive du MR dans l'œil pourrait contribuer au développement de l'œdème rétinien en conditions pathologiques en favorisant l'inflammation, stress oxydant et angiogenèse qui perturbent l'homéostasie du fluide dans la rétine. L'objectif de cette étude est donc d'identifier le rôle du MR dans l'œdème rétinien et de proposer éventuellement de nouveaux traitements par l'antagoniste du MR.

C'est une étude translationnelle qui nous permettrait non seulement de mieux comprendre la physiopathologie des maladies rétiniennes œdémateuse, mais aussi de développer de nouveaux traitements alternatifs ou complémentaires de ceux qui existent déjà en clinique. L'utilisation de l'animal entier ne peut pas être remplacée, car nécessaire pour apprécier les mécanismes physiopathologiques intégrés. Les modèles de néovascularisation choroidienne (CNV, 180 rats et 72 souris), d'uvéite auto-immune (EAU, 192 rats) et de diabète de type 2 (96 rats) et de type 1 (144 rats et 144 souris) seront utilisés. L'utilisation des examens *in vivo* permet d'évaluer la progression de la maladie ou les effets thérapeutiques chez un même animal et de réduire le nombre d'animaux sacrifiés. Les procédures utilisées dans l'étude peuvent entraîner une souffrance modérée pour les animaux. Pour éviter la douleur pendant la procédure, l'anesthésie sera réalisée préalablement. Des soins adéquats ont été prévus et seront mis en place avant, pendant et après chaque procédure. Les points limites précoces ont été aussi prévenus pour réduire la douleur et la souffrance.

2647- La dialyse est un traitement de purification du sang couramment utilisé par plus de 35 000 personnes en France. Cette méthode de soins consiste en l'épuration extra-corporelle du sang, chez un patient vigile. Elle est sans douleur pour le patient humain ou animal. Les séances sont répétées régulièrement chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique. Afin d'améliorer l'efficacité des séances de dialyse, il est nécessaire de faire progresser le matériel utilisé et les modalités de réalisation des séances. Il est indispensable de tester les nouveaux matériaux et nouvelles stratégies de dialyse dans des modèles qui se rapprochent le plus possible de l'homme. Les moutons, qui représentent une masse corporelle et un volume sanguin identiques à ceux de l'homme les meilleurs modèles pour mettre au point, valider et contrôler les dispositifs de dialyse. Sur les cinq prochaines années, notre plate-forme de dialyse devrait utiliser 60 moutons au maximum. C'est le nombre le plus élevé de moutons qui

nous sera nécessaire si la demande de test et mise au point de membranes de dialyses est importante. Les moutons, sont maintenus au prè entre deux séances de dialyse, en troupeau équilibrés. Le mouton dialysé est toujours accompagné d'un congénère pour limiter le stress qui serait provoqué par un éventuel isolement. Ils sont soignés par du personnel formé et surveillés pour les éventuelles conséquences de dialyses, à long terme par une équipe de vétérinaire qualifiés.

2648- L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes conduisant à la digestion de leur contenu par les hydrolases lysosomales. L'exécution et la régulation de l'AP mettent en jeu des gènes spécifiques, ATG, et différentes voies de signalisation. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies neurodégénératives et cancers. La restriction calorique est un inducteur majeur de l'AP. Récemment, plusieurs équipes se sont intéressées à l'apport bénéfique de la restriction calorique dans le traitement des cancers. Récemment, il a été démontré qu'une courte période de jeûne protège les cellules normales de l'effet cytotoxique de composés utilisés pour la chimiothérapie des cancers. Dans le même temps, la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par ces composés chimiothérapeutiques était augmentée. La transposition du jeûne à la chimiothérapie du cancer reste difficile à appliquer dans un contexte clinique; certains patients pourraient ne pas tolérer un jeûne prolongé. Une stratégie consiste à substituer le jeûne par l'administration de composés capables de mimer la restriction calorique (CRMs, caloric restriction mimetics). Ce mimétisme se traduit au niveau cellulaire par une réduction de l'acétylation des protéines cytosoliques associée à l'induction de l'autophagie. Ce projet a pour buts d'évaluer *in vivo*: 1) l'induction de l'AP dans les tissus sains et tumoraux chez des animaux traités par les CRMs; 2) le rôle de l'AP et du système immunitaire dans la sensibilisation des tumeurs à la chimiothérapie immunogène combinée à ces CRMs; 3) l'efficacité thérapeutique de cette nouvelle stratégie combinatoire anticancéreuse. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences de croissance tumorale chez la souris. Nous avons besoin de réaliser des expériences *in vivo* chez les souris afin de pouvoir confirmer nos données obtenus *in vitro*. Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation du système immunitaire et de l'autophagie systémique en réponse à la chimiothérapie. Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (n=5292) et transgéniques (n=2502). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Ce projet prévoit 4 procédures qui sont conséquentes: les procédures 2 et 3 seront mise en place seulement si la procédure n. 1 a confirmé l'hypothèse de travail; la procédure 4 sera effectuée seulement si les procédures 2 et 3 seront significatives et on utilisera seulement les molécules qui ont données les meilleurs résultats. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Néanmoins, nous pourrions avoir à utiliser moins de souris si la significativité apparaît avec moins de souris. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et

adapté en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, des tunnels en cartons et bâtonnets à ronger).

2649- Dans les pays occidentaux, l'accident vasculaire cérébral (AVC) est une cause majeure de handicap acquis de l'adulte, la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer et la troisième cause de mortalité. L'AVC est souvent responsable de séquelles qui affectent la qualité de vie des patients. Les atteintes peuvent être motrices, sensibles, sensorielles et cognitives (avec notamment des troubles de la mémoire). En outre, les dépressions sont fréquentes. Il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de l'AVC en dehors de la thrombolyse et des traitements administrés en prévention secondaire. La metformine est une molécule déjà anciennement utilisée dans le traitement du diabète de type II, et qui est de plus le traitement de première intention chez le patient diabétique en surpoids. Des travaux ont permis de suggérer un effet neuroprotecteur de la metformine au cours des AVC et des accidents ischémiques transitoires. Nous conduisons actuellement une expérience sur l'impact d'un traitement par la metformine sur les atteintes ischémiques post-AVC dans un modèle d'insuffisance rénale chronique (IRC) chez la souris. L'intérêt d'étudier l'AVC au cours de l'IRC est dû au fait que l'IRC est associée à une augmentation du nombre et de la sévérité des AVC ischémiques et une augmentation de la survenue de démence d'origine vasculaire notamment. Le but du présent projet et de compléter les études en cours en déterminant l'expression de l'AMP kinase chez les souris traitées ou non par metformine. Nous utiliserons un lot de souris IRC non traitées par la metformine et 2 lots de souris non IRC traitées ou non par la metformine. Toutes les souris auront un AVC. Toutes les précautions d'usage en termes d'analgésie et d'anesthésie seront prises afin de soulager et limiter la douleur des animaux lors des différentes expériences. Ces expériences ne peuvent à l'heure actuelle être réalisées qu'avec l'utilisation de modèles animaux, la complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'IRC et les AVC ne permettant pas les études in silico. Le choix du modèle animal s'est porté sur la souris suite à la possibilité de disposer d'un modèle d'IRC chez la souris au laboratoire. Le nombre d'animaux est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique des résultats et éviter une impossibilité de conclure par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux. Les expériences décrites dans ce projet nécessitent 26 animaux.

2650- La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie biliaire fibrosante pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement médical. L'objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la CSP et d'identifier des cibles thérapeutiques. L'hypothèse de travail de notre projet est que le récepteur nucléaire de la vitamine D (VDR) a un rôle protecteur dans la CSP. Nous allons évaluer in vivo l'impact de VDR dans un modèle de CSP. Pour réaliser cette évaluation, nous produisons une invalidation de VDR dans le modèle murin le mieux établi de CSP. Ainsi, nous développons des souris doublement invalidées pour Vdr et Abcb4. Nous testerons également l'effet d'agonistes de VDR chez les souris invalidées pour Abcb4.

Le projet permettra de caractériser un nouveau modèle de CSP dans le but de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans la CSP et de mieux définir la place de VDR comme cible thérapeutique dans cette maladie.

Le projet a donc pour objectif d'étudier l'implication éventuelle de VDR dans la CSP. La CSP faisant appel à l'interaction de différents tissus exprimant VDR, l'implication de VDR dans cette pathologie ne pouvait être abordée que par l'analyse d'animaux invalidés génétiquement pour VDR. Pour répondre à l'objectif de l'étude, nous produirons donc des souris invalidées à la fois pour Abcb4 et Vdr.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 220 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Au cours de ce projet, un objectif de réduction du nombre des animaux engagés sera poursuivi avec insistance. D'une part, par le raffinement des protocoles décrit dans la saisine. D'autre part, par la validation de l'utilisation de méthode de suivi non invasive (i.e. imagerie par imagerie par résonance magnétique ou IRM).

2651- Ce projet décrit les essais de recherche d'agents étrangers sur animaux réalisés selon les exigences réglementaires. Ces essais ont pour objectif la recherche d'éventuelles contaminations des cultures cellulaires utilisées dans la fabrication de vaccins destinés à l'homme. Ces tests consistent à administrer un produit (lot de semence virale ou banque cellulaire) à des animaux et à vérifier l'absence de signes cliniques liés à une contamination du produit par des micro-organismes.

Ce projet représente l'ensemble des essais menés sur chaque lot de semence virale ou culture cellulaire employés dans la fabrication de vaccins commercialisés ou en développement.

Les espèces employées pour ces tests sont la souris, le cobaye et le lapin, chacune s'avérant plus particulièrement sensible à certains microorganismes.

Aucun signe clinique n'est en principe attendu dans ces tests. Les voies d'injections, qui sont définies par les textes réglementaires européens et internationaux.

Dans le cas où les animaux présenteraient une dégradation de l'état général, des lésions ou symptômes nécessitant l'euthanasie, celle-ci sera effectuée selon une méthode recommandée. La prise en charge d'un animal ayant des signes cliniques de maladie est réalisée sous la responsabilité d'un vétérinaire.

Ce projet peut nécessiter l'utilisation de 3945 souris, 210 cobayes et 150 lapins sur une période de 5 ans.

Les résultats attendus de ce projet sont d'une part de contribuer à la libération de lots de produits fiables et conformes aux spécifications et aux textes de référence en vigueur et d'autre part, d'assurer le niveau de formation / qualification du personnel pour chacun de ces tests conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Suite à l'atteinte du point limite ou en fin de test, la majorité des animaux utilisés est euthanasiée selon les méthodes recommandées par la réglementation, par la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux et approuvées par le Comité d'Éthique. En l'absence de signes cliniques, des animaux peuvent être réutilisés pour des besoins de formation dans le respect des exigences réglementaires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : Aucune méthode évitant totalement le recours à l'animal selon les exigences réglementaires de tous les pays de destination n'est développée à ce jour pour les procédures du présent projet. Certains modèles sont cependant remplacés par des tests *in vitro* lorsque la réglementation le permet.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins de tests sur la période.

Le nombre d'animaux par groupe est défini par la réglementation ou par une étude statistique. Il ne peut être pas réduit en deçà. En revanche, une optimisation visant à réduire le nombre de groupes témoins est pratiquée aussi souvent que possible.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant des enrichissements dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires (ETS 123), et suivis par un personnel spécifiquement formé.

En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

2652- Le diabète de type 2 est un problème majeur de santé publique. Il est en constante augmentation dans notre société. En cause une augmentation de la prévalence de l'obésité, soit une augmentation de la masse du tissu adipeux (TA). Le TA participe au maintien de la glycémie. Le développement excessif du TA provoque un changement des cellules immunitaires au sein du tissu adipeux, dont les macrophages, conduisant à une inflammation à bas bruit. Cette inflammation perturbe alors les fonctions de l'adipocyte et participe au développement du diabète de type 2. Une analyse de l'expression des gènes des macrophages purifiés à partir de TA de patients obèses a mis en évidence une diminution d'expression d'une protéine de l'endocytose. Nos résultats confirment cette réduction dans les macrophages du TA de souris obèses. Nous voulons donc déterminer l'impact de l'inactivation de cette protéine de l'endocytose dans les macrophages sur la fonction des macrophages et sur le développement de l'obésité et des complications métaboliques chez la souris. Aucune étude publiée à ce jour n'a exploré le rôle de cette protéine dans le contexte du diabète de type 2. Pour cela, nous devons invalider le gène de cette protéine dans les macrophages *in vivo*. En effet, les lignées cellulaires de macrophages sont imparfaites et les techniques de transfection (lipofection, adénovirus) perturbent les fonctions des macrophages. Nous avons donc besoin de cellules primaires purifiées à partir de souris n'exprimant plus notre protéine d'intérêt dans les macrophages pour étudier le lignage monocytaire. De plus, la caractérisation des conséquences métaboliques ne peut se faire que sur un organisme entier. Nous utiliserons donc un modèle de souris génétiquement modifiées d'inactivation de cette protéine spécifiquement dans les macrophages. Nous soumettrons les souris à un régime riche en lipides et déterminerons les conséquences sur la prise de poids et les conséquences sur le contrôle de la glycémie. Ce travail nous permettra de déterminer si la perte d'expression de la protéine de l'endocytose dans les macrophages, observées lors de l'obésité, contribue à l'obésité et/ou aux complications métaboliques.

Au final ce projet présentera un rapport avantage/dommages positif puisqu'il doit contribuer à améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du diabète de type 2 chez l'homme en utilisant (i) un modèle établi de souris (fond génétique C57Bl6) qui ne présente pas de phénotype dommageable et (ii) des procédures expérimentales qui n'affectent que faiblement les conditions de vie de l'animal. Pour satisfaire à la réduction la procédure prévoit d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaires à des études statistiques pertinentes: 240 souris mâles. Les souris femelles seront utilisées pour prélèvement de cellules primaires du lignage monocytaire à partir de moelle osseuse (hors procédure). Pour satisfaire au remplacement, nous avons inhibé l'expression de Rab4b dans la lignée de macrophages RAW par interférence ARN. Nous nous sommes malheureusement heurtés à de nombreux problèmes techniques. De plus, aucune lignée de macrophages ne permet d'étudier tous les aspects de la fonctions du lignage monocytaire. L'utilisation des cellules primaires est donc nécessaires.

Pour le raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés et les personnes réalisant la procédure sont autorisées et appliqueront les règles d'éthiques. L'environnement est amélioré pour diminuer le stress. Le suivi sanitaire régulier permettra d'identifier les souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible.

2653- L'étude des effets des nanomatériaux est fondamentale afin de transférer le développement des nanotechnologies émergentes en action. Les humains sont directement exposés à ces nanomatériaux par différentes voies comme l'inhalation, le contact avec la peau ou l'ingestion, ou durant une exposition intentionnelle à des fins biomédicales, par exemple comme vecteurs de molécules thérapeutiques ou outils pour le diagnostic. L'objectif de ce projet est de tester l'impact de ces matériaux sur un organisme vivant complet. Pour ce faire nous administrerons des nanomatériaux différents à deux concentrations dans des souris de souche BALB/cN disposant d'un système immunitaire compétent. Dans un but de réduction du nombre d'animaux, et suite aux résultats des expériences faites *in vitro* sur des cellules isolées, nous utiliserons 8 animaux par groupe qui est le nombre minimum statistique. Dans l'optique de réduire le nombre d'animaux utilisés, une approche par analyse de la variance (ANOVA), suivie d'un test post-hoc pour les comparaisons multiples, est utilisée pour l'analyse

statistique. Cette méthode a été choisie en raison de la possibilité de l'appliquer aux groupes expérimentaux représentés par des faibles nombres d'individus. Nous favoriserons également le test de plusieurs conditions et types de matériaux en parallèle afin de ne pas multiplier les groupes contrôles. Nous utiliserons 864 souris. Nous allons prendre toutes les précautions pour le respect de la règle des 3R. Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage (souris rassemblées en groupes sociaux) et dans des cages comportant des enrichissements (nids). Notre animalerie fait bénéficier aux animaux de conditions de température et d'hygrométrie régulées ainsi que d'accès à la nourriture et à la boisson ad libitum. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'expérimentation (compétences des personnels expérimentateurs et soignants, méthodes de manipulation) afin d'assurer à nos animaux les meilleures conditions de vie. Avant chaque prélèvement sanguin ou injection, les souris seront anesthésiées. Enfin, les souris seront observées quotidiennement et les dispositions adéquates seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites. La règle du remplacement n'est pas applicable ici: en effet, nous devons avoir recours à un modèle in vivo afin d'étudier les effets de nanomatériaux sur le système immunitaire et sur les principaux organes impliqués dans leur métabolisme (foie, reins).

2654- L'un des rôles clés de l'ovaire est la production des ovocytes ou gamètes, qui sont les cellules reproductrices appelées également cellules germinales. Ces cellules sont essentielles à la survie des espèces sexuées par transmission de l'information génétique d'une génération à la suivante. Pour cela, les cellules germinales doivent se diviser par mitose pour constituer un stock suffisant d'ovocytes, puis entrer en méiose pour devenir haploïde et donner les gamètes. Cette entrée en méiose caractérise l'état sexuellement différencié des ovocytes. Elle a lieu au cours de l'embryogenèse chez la femelle et à la puberté chez le mâle.

Des expériences sur culture de gonades in vitro ont conduit à l'identification d'une molécule l'acide rétinolique (AR), qui a été décrite comme le facteur indispensable à l'entrée en méiose des cellules germinales mâles et femelles. Cependant il vient d'être montré que les cellules germinales entrent en méiose en l'absence de cette molécule in vivo chez un modèle de souris mâle. En fait l'AR est utilisé plus tardivement dans le déroulement de la méiose. Nous faisons l'hypothèse que ce mécanisme aussi fondamental que l'entrée en méiose répond aux mêmes stimuli chez le mâle et la femelle, et nous voulons savoir si l'AR agit sur le contrôle de la méiose dans l'ovaire. Etant donné, les résultats faussés obtenus par les expériences in vitro, nous proposons d'utiliser un modèle murin ne produisant pas d'AR dans la gonade femelle. Cette analyse nécessite l'utilisation d'un modèle de souris dont l'ablation des gènes impliqués dans la synthèse de l'AR se fait de façon conditionnelle après la formation de l'ovaire. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 95 souris. Nous étudierons comment l'ablation de ces gènes induit les anomalies de formation des gamètes en étudiant les ovaires des fœtus mutés en comparaison avec ceux de fœtus témoins. Dans un but de raffinement, les animaux seront hébergés par deux ou par trois dans des cages comportant des objets à ronger et des igloos pour se faire un nid de façon à garantir leur bien-être et leur permettre d'exercer les activités spécifiques à leur espèce. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés. Dès que nous atteindrons le nombre suffisant d'échantillons pour conclure nos résultats de façon significative, nous arrêterons nos expérimentations.

Cela va nous permettre de définir le rôle de l'AR dans la différenciation des gamètes et la fertilité. Ces données sont essentielles pour comprendre la différenciation des gamètes. On estime que 60 à 80 millions de couples sont confrontés à l'infertilité à l'heure actuelle et dans la plupart des cas, les cliniciens ne peuvent pas proposer un diagnostic aux patients. De plus identifier les processus régissant la mise en place de la méiose est un prérequis pour envisager des thérapies des problèmes d'infertilité.

2655- La peau forme la couche externe protectrice du corps dont l'intégrité doit être maintenue tout au long de la vie. Ainsi, les processus de cicatrisation cutanée sont initiés immédiatement après blessure. Des défauts de cicatrisation (efficacité, rapidité) apparaissent avec le vieillissement, lors de pathologies (diabète) ou encore dans le cas de grands brûlés, et représentent un défi clinique majeur. Ce projet a pour but d'étudier l'effet de l'injection de particules extracellulaires (en particulier exosomes) sur la vitesse de cicatrisation cutanée. Nos résultats in vitro montrent une accélération de la cicatrisation avec un effet bénéfique à long terme potentiellement très intéressant. Nous souhaitons donc maintenant valider les effets in vivo.

Pour cela, nous utiliserons deux modèles murins: 1) souris wt dont la cicatrisation est rapide ; et 2) souris génétiquement modifiées présentant un délai de cicatrisation (modèle de KO conditionnel pour CD98hc, protéine transmembranaire exprimée à la fois dans les kératinocytes et les fibroblastes dermiques) qui récapitule en partie les conditions de retard observées chez les patients (cf plus haut).

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir du nombre minimum d'animaux. Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins car les animaux transgéniques sont facilement disponibles et sont les plus couramment utilisés en laboratoire. Aussi souvent que possible, les expériences seront réalisées in vitro sur des cellules en culture. Cependant, la complexité de la peau, de part la présence de nombreux types cellulaires d'origine embryonnaire différente, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Les expériences seront effectuées en limitant au minimum 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.

2656- Maladie du follicule pilosébacé, l'acné touche en France environ 15 millions de personnes : 80 % des adolescents (dont 15 % avec une acné sévère) et près de 25 % des adultes, en particulier des femmes. Il s'agit d'une maladie chronique qui provoque l'obstruction des pores de la peau et l'apparition de différentes lésions : comédons (points noirs et blancs) et « boutons » (papules, pustules voire nodules). En fonction des lésions présentes et de la surface de peau atteinte, l'acné présente plusieurs niveaux de sévérité : très légère, moyenne, sévère et très sévère.

L'acné est la maladie de la peau qui a les répercussions psychologiques les plus importantes chez les patients et peut altérer la qualité de vie : troubles de l'humeur, dépression, altération de l'image de soi, difficultés relationnelles... Dans les cas sévères, l'acné peut également entraîner la formation de cicatrices occasionnant dans les cas les plus graves un aspect grêlé du visage.

Il est donc important d'avoir un modèle préclinique prédictif de l'acné. Afin d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

- Il n'existe pas de modèle *in vitro* d'acné pouvant remplacer complètement la peau en tant que tissu biologique vivant. Il existe cependant des modèles *in vitro* qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal.

- Ces modèles *in vitro* ne permettent pas de tester des produits thérapeutiques ou des dispositifs médicaux appliqués directement sur la peau en application externe (voie dermique / topique)

- L'efficacité ne pouvant être complètement testée *in vitro*, des premières preuves d'efficacité *in vivo* doivent être apportées avant de passer au stade clinique de développement de ces molécules (tests cliniques chez l'homme)

Ce projet s'effectuera chez la souris (*Mus musculus*) et le hamster (*Mesocricetus auratus*).

Il est prévu d'utiliser 520 souris et 150 hamsters sur une période de 5 ans pour permettre l'évaluation de l'efficacité de nouvelles molécules pharmaceutiques (non cosmétiques) à visée dermatologique ayant une indication anti-acnéique.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : L'utilisation des animaux en tant que modèle animal d'acné ne sera utilisé qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.

- Réduction des animaux: Le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 6 à 8 animaux par groupe.

Raffinement : Evaluation de points finaux tous les jours (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites), enrichissement du milieu dans les cages.

2657- La dépression est une pathologie chronique pour laquelle les approches thérapeutiques sont complexes. Actuellement, les antidépresseurs proposés en première ligne de traitement restent confrontés à des problèmes d'efficacité mais aussi d'effets secondaires néfastes pour le patient. Il est donc nécessaire de mieux comprendre leur mode d'action afin d'améliorer l'offre thérapeutique. Notre projet se situe dans ce contexte pour identifier une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

L'expression de cette cible protéique exprimée dans une population de cellules nerveuses est altérée dans des modèles précliniques de dépression chez le rongeur mais également dans les cerveaux obtenus post-mortem à partir de patients dépressifs. Par ailleurs, plusieurs études y compris les nôtres, ont montré dans des modèles en culture que les antidépresseurs modulent l'expression et la fonction de cette protéine. Aussi pour mieux comprendre i) quelles sont les fonctions de cette cible touchées dans la dépression et ii) comment les antidépresseurs agissent sur l'expression et les fonctions de cette molécule, il est nécessaire de reproduire les résultats obtenus en culture dans un modèle *in vivo*.

Pour cela, nous nous proposons d'utiliser un modèle aigu de dépression chez la souris permettant d'obtenir en 24h des symptômes de dépression comparables à ceux observés dans les modèles chroniques. Cette étude pourrait permettre de valider l'implication de notre cible dans la dépression mais également dans le mode d'action des antidépresseurs, ouvrant ainsi de nouvelles pistes thérapeutiques. La procédure expérimentale utilisée est peu douloureuse. Pour réduire le stress, les animaux seront maintenus dans leur cage d'hébergement en présence de leurs partenaires habituels. Ils seront surveillés 2 fois au cours des 24h d'expérimentation puis seront euthanasiés selon les bonnes pratiques zootechniques (procédure validée par le comité d'éthique). Les effets engendrés sur notre cible seront évalués *ex vivo* sur des tranches de cerveau prélevés après euthanasie des animaux.

Nous estimons à 180 souris jeunes adultes le nombre d'animaux nécessaires, nombre minimum requis pour réaliser des tests statistiques comparant les animaux contrôle et dépressifs et les animaux dépressifs traités ou non par les anti-dépresseurs (trois molécules différentes seront utilisées).

2658- Ce projet a pour but de mieux comprendre les causes de l'autisme au niveau cérébral, en particulier le cervelet sera étudié. En effet chez les enfants autistes le cervelet est hypotrophié et certains troubles moteurs sont détectés. L'étude que nous allons mener sur ce modèle de souris autistique (par traitement au valproate) comportera des tests comportementaux validant le modèle, il étudiera l'anatomie et l'organisation cellulaire du cervelet ainsi que les propriétés synaptiques du réseau cérébelleux à partir de tranche de cervelet (étude électrophysiologique). Le modèle animal que je propose d'utiliser est déjà largement étayé dans la littérature et fait référence à des cas cliniques.

Il s'agit de souris mâles dont la mère a été traitée pendant la gestation par une injection intra-péritonéale de valproate de sodium (médicament qui traite certaines formes d'épilepsie). Cette souris va présenter à l'âge adulte des troubles du comportement de type autistique et est considérée par la communauté scientifique internationale comme un modèle d'étude

de l'autisme. Ce modèle se distingue des modèles de souris génétiquement modifiées. En effet il cible préférentiellement certaines structures du système nerveux, tel le cervelet et reproduit certaines observations faites sur les enfants autistes.

Le projet de recherche que nous développons tient compte du bien-être animal en respectant le principe des 3R. Le nombre d'animaux utilisé sera réduit, en effet une souris gestante injectée par le valproate fournira 4 à 6 souriceaux présentant des troubles autistiques et les injections seront arrêtées dès qu'un nombre suffisant de données aura été obtenu pour assurer la significativité de nos résultats. Les études histologiques comportementales et électrophysiologiques se feront à partir des mêmes animaux ce qui va également réduire le nombre d'animaux utilisés. Mis bout à bout l'ensemble des paramètres que nous allons observer à travers l'ensemble de ces techniques requerront au maximum 1000 animaux. De plus, les animaux seront hébergés en groupes de 2 à 5 individus après sevrage, en présence de matériel de nidification (igloos) et enrichissement dans les cages (bâtons à ronger). Nous ne pouvons toutefois pas nous passer du modèle animal car l'autisme est une pathologie complexe qui ne peut être modélisé qu'au niveau de l'animal entier, exprimant toute la variété de son répertoire comportemental.

D'un point de vue éthique, les mères injectées ne comportent pas de troubles décelables du comportement. Les troubles des souriceaux sont légers et ne requiert de soins particuliers.

2659- La mélatonine est une hormone de la glande pinéale dont la durée du pic nocturne de sécrétion est proportionnelle à la durée de la nuit c.a.d. de la photopériode. La mélatonine régule plusieurs fonctions saisonnières dont l'hibernation. L'objectif de cette étude est de déterminer l'implication des récepteurs de la mélatonine dans les processus d'hibernation du hamster syrien.

Dans ce but, des hamsters syriens mâles sont maintenus pendant 5 semaines soit en photopériode longue PL (été), soit en photopériode courte PC (hiver) avec une température ambiante de 22°C (Ta22), soit en conditions d'induction de l'hibernation (photopériode courte et température ambiante à 8°C, Ta8). La température corporelle, indicatrice de l'état d'hibernation, est suivie grâce un capteur de température implanté dans la cavité péritonéale pendant la durée de l'expérience. Les animaux sont mis à mort à différents états d'hibernation (normothermie ou hypothermie) pour des prélèvements de plusieurs tissus pour analyser l'expression des différents récepteurs de la mélatonine.

Pour réaliser ce projet nous avons besoin de 64 hamsters syriens mâles répartis sur 4 groupes de 8 animaux et l'expérience sera renouvelée une fois. Les conditions expérimentales pour chaque groupe sont : 1) PL et Ta22, conditions de normothermie; 2) PC et TA22, conditions de normothermie ; 3) PC et Ta8, conditions d'hypothermie en hibernation ; 4) PC et Ta8, conditions de normothermie après un épisode d'hibernation.

Nous porterons une attention particulière aux aspects éthiques de la recherche sur animal. En termes de remplacement, nous ne pouvons pas travailler sur des cellules isolées sur l'animal entier car les processus d'hibernation sont complexes et incluent l'ensemble de l'organisme. En termes de réduction, nous avons établi un nombre d'animaux à 8 par groupe expérimental pour obtenir des résultats statistiquement valides et nous aurons besoin de 64 hamsters syriens au total sur 5 ans. En termes de raffinement, le milieu sera enrichi avec un nid et un barreau à ronger. Bien que ce projet nécessite une approche invasive (implantation intrapéritonéale de capteurs-enregistreurs de température, le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience (habituation à l'expérimentateur, anesthésiques, analgésiques, suivi du score de douleur).

2660- Le traitement du cancer nécessite le développement de nouvelles molécules en recherche. Notre équipe a évalué, in vitro, le potentiel anti-prolifératif de plus d'une centaine de molécules de synthèse sur de différentes lignées cancéreuses que ce soit des cancers solides (cancer du foie, cancer du pancréas, cancer du poumon et cancer du sein) et un cancer hématologique (myélome multiple). Parmi l'ensemble des molécules testées, une molécule de synthèse, nommée B1, a montré un fort potentiel thérapeutique in vitro et a donc été sélectionnée pour évaluer son activité anti-cancéreuse chez la souris.

Ce projet consiste à tester l'efficacité thérapeutique, de ce composé synthétique B1, en étudiant plusieurs voies d'administration (voies orale per os, intra-péritonéale i.p et intraveineuse i.v) sur les cancers solides suivants : cancer du foie, cancer du pancréas, cancer du poumon, cancer colorectal, et hématologique de myélome multiple chez la souris. Afin de montrer l'efficacité de la molécule B1 dans ce modèle, 750 souris seront nécessaires. Les souris qui seront utilisées dans cette étude sont de la lignée dite « Nude » caractérisée par l'absence de la défense immunitaire cellulaire (souris immunodéficientes). Cette souche de souris permet le développement des masses tumorales induites par injections de cellules cancéreuses humaines. Afin d'améliorer le confort et le statut social des animaux, des cages avec enrichissement (roue d'activité...) sont aménagés. De plus, tout signe de souffrance sera étroitement surveillé et en cas de présence, entrainera un arrêt immédiat de l'expérimentation.

Aucun autre modèle animal ne permet de tester l'effet de molécules sur les cancers humains. Ces tests permettront de définir les posologies minimales efficaces qui donneraient un effet thérapeutique optimisé chez l'Homme (plus d'efficacité, moins de toxicité et d'effets secondaires). Les résultats de cette étude sont nécessaires avant de tester cette molécule chez l'Homme. Le nombre d'animaux nécessaires pour valider l'efficacité, optimiser les posologies et les voies d'administration chez l'Homme a été estimé en fonction des tests statistiques nécessaires pour démontrer les effets de la molécule. La réduction du nombre d'animaux dans nos différents groupes ne nous permettrait pas de conclure, via une analyse statistique fiable, sur l'efficacité thérapeutique de la molécule B1.

Compte tenu du potentiel de valorisation de ce projet, il est strictement confidentiel. Toute personne, travaillant sur ce projet, a donc signé une charte de haute confidentialité et nous ne pourrions pas, dans le cadre de cette demande, décrire les doses et la structure de la molécule testée.

2661- 56 rats Wistar maximum seront nécessaires pour compléter les 2 phases du projet présenté.

Dans la phase 1 du projet, nous voulions tester, sur un modèle de choc hémorragique contrôlé, différents modes de réanimation, en particulier deux modes automatisés d'administration du remplissage vasculaire et/ou de la noradrénaline vs administration manuelle. Quatre des 6 groupes prévus ont été réalisés avec succès. En revanche, nous avons rencontré des problèmes dans le paramétrage des algorithmes pour l'administration automatisée de la noradrénaline dans les deux derniers groupes. De ce fait nous demandons dans cet amendement 2x 10 rats pour réaliser ces deux groupes (20 rats supplémentaires). Afin de respecter une randomisation minimale pour la comparaison des groupes, il est nécessaire d'ajouter 2 animaux dans les 4 groupes déjà réalisés (8 rats supplémentaires).

La phase 2 n'a pour le moment pas débuté. Dans cette phase, nous avons prévus de comparer l'administration automatisée du remplissage vasculaire + noradrénaline avec le meilleur algorithme (obtenus dans la phase 1) par rapport à l'administration manuelle sur un modèle de choc hémorragique non contrôlé. L'administration manuelle prévue était, comme pour la phase 1, une administration au pousse seringue à débit constant avec arrêt et mise en route manuelle (boucle ouverte). Toutefois l'examen des résultats de la phase 1 diffèrent de ce qui est observée en pratique clinique au cours de laquelle le traitement administré chez les patients instables repose sur des bolus de solutés de remplissage. Afin de nous rapprocher cette situation clinique, nous souhaitons compléter les groupes de la phase 2 par 2 groupes supplémentaires de 12 rats utilisant un mode de remplissage vasculaire manuel par bolus associé ou non à la noradrénaline (24 rats supplémentaires). Par ailleurs, l'hémorragie non contrôlée étant un modèle plus difficile à réaliser que l'hémorragie contrôlée (phase 1), nous souhaiterions ajouter 2 rats supplémentaires dans les 2 groupes initialement prévus dans la phase 2 de la saisine #958 (4 rats supplémentaires).

Les 56 animaux supplémentaires demandés dans cet amendement seront soumis aux mêmes procédures que celles présentées dans la saisine #958 (28 rats dans chacune des 2 procédures).

2662- Des études récentes montrent que la cicatrisation complète de la muqueuse intestinale réduit les taux de rechute et d'hospitalisation et le recours à la chirurgie chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI). L'idée de diminuer le risque de rechute en favorisant la cicatrisation muqueuse et plus particulièrement la réparation de l'épithélium intestinal via l'alimentation, constitue une nouvelle piste de recherche. A ce jour, quelques rares travaux scientifiques ont étudié le rôle spécifique de certains nutriments après un épisode inflammatoire, et on ignore encore si l'apport en protéines alimentaires est susceptible d'améliorer la cicatrisation intestinale. Bien qu'il existe des raisons de penser que le besoin protéique est augmenté pendant et après un épisode inflammatoire afin d'assurer la cicatrisation des zones lésées (notamment en fournissant des acides aminés pour la synthèse de composants cellulaires), on ne connaît pas l'impact d'un apport majoré en protéines via l'alimentation dans ces conditions. Dans ce but, nous testerons l'effet de différents niveaux d'apport protéique (moyen, modérément élevé et élevé) sur le processus de cicatrisation dans un modèle de colite induite chimiquement chez la souris. Après l'induction d'un épisode inflammatoire colique, les animaux recevront des régimes dont la proportion en protéines alimentaires varie (14, 30 et 53%) pendant différents temps pour en étudier les effets sur la cicatrisation de la muqueuse en mesurant des paramètres cliniques, histologiques et biochimiques au niveau de l'épithélium colique endommagé. Cette étude préclinique vise à terme à mieux définir l'influence de l'apport en protéines alimentaires nécessaires à la réparation épithéliale après un épisode inflammatoire intestinal chez les patients atteints de MICI. La question d'une nutrition pertinente convenant à des patients en phase de cicatrisation post-épisode inflammatoire est une question non résolue fréquemment posée aux cliniciens.

Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal dans un modèle animal que nous avons bien caractérisé (modèle de colite chimio-induite). Le nombre de souris C57BL/6 utilisé est de 288 (12 par groupe x 3 régimes x 3 temps d'étude plus les groupes contrôles x 2 expérimentations), ce qui correspond au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique, prenant en compte la variabilité interindividuelle et le fait que nous testons un effet nutritionnel qui est fort probablement de faible intensité. Nous veillerons à réaliser le maximum de prélèvements sur chaque animal euthanasié afin de limiter le nombre total d'animaux à utiliser. Pour ce faire, parallèlement à l'étude de suivi quotidien (scores inflammatoires, poids corporel, prise alimentaire), nous combinerons différentes approches : fonctionnelle (tests de perméabilité, absorption colique d'eau), biochimique (mesure de paramètres inflammatoires et cicatriciels, mesure de la synthèse protéique), histologique (évaluation de la ré-épithélisation, expression de protéines clés, prolifération / différenciation / apoptose) et transcriptomique (analyse des réseaux de gènes) afin d'évaluer l'effet des différents niveaux d'apport protéique au cours du processus de cicatrisation colique.

Les procédures stressantes seront limitées au maximum et un enrichissement du milieu sera réalisé (nid et tunnel en PVC sanitaire opaque adapté aux souris). Le projet s'inscrit dans le cadre d'études pré-cliniques visant à établir à terme des recommandations nutritionnelles pour les patients atteints de MICI. Les objectifs du projet ne peuvent donc être atteints sans recours à un animal modèle de l'Homme (modèle de colite chimio-induite). Les procédures expérimentales ne peuvent donc pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

2663- La douleur viscérale (sensation de cisaillement, tension, brûlure, crampe...) est un symptôme courant à l'origine de millions de visites en consultation externe. Les enquêtes statistiques nationales sur l'impact des maladies gastro-intestinales (GI) mentionnent systématiquement la douleur viscérale comme le symptôme le plus fréquent motivant une visite en

consultation externe. Environ 5 % des patients suivis en médecine générale et 40 % des patients suivis en hépatogastroentérologie présentent un trouble fonctionnel GI et la douleur constitue le symptôme le plus fréquent et le plus difficile à traiter. Ces patients nécessitent des ressources considérables en matière de soins de santé, le coût annuel des traitements s'élevant à 16,6 milliards de dollars aux États-Unis et à 28,4 milliards d'euros en Europe.

Les méthodes alternatives, permettant une évaluation nociceptive viscérale, sont inexistantes. Ainsi, ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale afin de valider de nouveaux candidats médicaments pour le traitement des douleurs viscérales. Les modèles d'hypersensibilité viscérale induits par des agents chimiques chez la souris sont des modèles largement décrits dans la littérature car, peu invasifs, demandant peu de manipulation des animaux et permettant une observation sur les animaux vigiles afin d'être au plus près de la pathologie humaine.

L'objectif de cette étude sera donc d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques dans des modèles d'hypersensibilité viscérale chez la souris (évaluation nociceptive). Afin de répondre à cet objectif, le nombre d'animaux utilisés sera de 1680 souris en raison de 8 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Conformément à la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux. À savoir, des carrés de coton pur (type nestlets, permettant aux animaux de faire une nidation) ou des igloos.

Nous ne pouvons utiliser de médication analgésique puisque la douleur est le paramètre évalué. Cependant, un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter...),
- Vocalisation, tremblements...,
- Perte de poids élevée (mais < 20% du poids initial),
- Posture anormale (voûté ou déséquilibré pour soulager une zone douloureuse, démarche anormale, diminution des mouvements, prostration),
- Détection/présence d'une anomalie (plaie, pilo-érection...),

Dans le cas, où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et à la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage. Si l'état général de l'animal ne s'améliorait pas au cours de la journée (les observations s'effectuant le matin) et qu'aucune solution ne pouvait être apportée, ce dernier serait mis à mort. De même, si un animal avait une perte de poids supérieure à 20%, l'expérimentateur mettrait à mort l'animal.

2664- La cirrhose représente un véritable problème de santé publique. L'encéphalopathie hépatique est une des complications de la cirrhose. Elle est définie par des troubles des fonctions supérieures allant d'un simple ralentissement jusqu'au coma.

Les mécanismes entraînant la survenue de l'encéphalopathie sont mal compris et c'est la raison pour laquelle les traitements en sont limités. Une des hypothèses physiopathologiques est une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique ; les résultats préliminaires obtenus lors du Master 2 vont dans ce sens et montrent une augmentation de la perméabilité aux solutés. Il s'agit désormais de comprendre par quels mécanismes cette perméabilité est augmentée : modification des jonctions serrées inter-cellules endothéliales ? rôle de l'inflammation ?

Notre projet a pour but d'explorer cette hypothèse en étudiant les cerveaux de 500 rats atteints de cirrhose et d'encéphalopathie, en privilégiant à chaque étape l'analgésie et le bien-être des animaux. Nous prévoyons par la suite de compléter l'étude en relayant les modèles animaux par des modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique afin d'explorer les mécanismes d'une éventuelle modification de perméabilité.

De plus, pour limiter le nombre d'animaux utilisés, nous pourrions séparer les deux hémisphères de chaque cerveau afin de concentrer le maximum de techniques sur un minimum de tissu. Cette étude portant sur du tissu cérébral *in toto* permettra de mieux caractériser les mécanismes de l'encéphalopathie et de dessiner de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Type d'animaux : rats Wistar mâles adultes

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 510 rats pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrits au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les phénomènes mis en jeu dans le développement de l'encéphalopathie hépatique sur cirrhose. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu. Notre choix s'est porté sur les rats car sa taille permet une faisabilité de l'étude anatomopathologique de l'encéphale. Les modèles existants de barrière hémato-encéphalique sont des cellules endothéliales de rat ; notre étude pourra donc ainsi compléter les données sans barrière d'espèce.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. À cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous prévoyons également de réaliser des groupes de mise au point des techniques afin de limiter le nombre total de rats nécessaire à la bonne conduite du projet. Les groupes contrôles (Sham ou Redoil) pourront être constitués d'un nombre plus limité d'animaux (10 vs 20).

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation,

les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

2665- La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie biliaire fibrosante pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement médical. Il s'agit d'une pathologie rare qui est fréquemment associée aux maladies inflammatoires de l'intestin (MICI), principalement la rectocolite hémorragique (RCH) mais également maladie de Crohn. Il est admis que les MICI résultent d'une rupture de l'équilibre entre le microbiote intestinal et le système immunitaire, et il est possible que les mêmes mécanismes interviennent dans la CSP.

L'objectif de notre étude est de vérifier l'hypothèse selon laquelle une dysbiose existe au cours de la CSP et contribue aux lésions fibro-inflammatoires de cholangite. Pour vérifier cette hypothèse, nous étudierons l'effet de l'induction de la colite dans deux modèles murins, le modèle reconnu de CSP, les souris invalidées pour *Abcb4* et un modèle développé dans notre laboratoire, les souris double invalidées *Abcb4-Vdr* donc les résultats préliminaires montrent une accentuation des lésions de CSP.

Nous évaluerons les conséquences de cette dysbiose sur le phénotype de CSP, notamment la fibrose biliaire. Une telle recherche de causalité ne pouvait être abordée que par l'analyse d'un modèle animal de CSP comme les souris invalidés génétiquement pour *Abcb4*.

Type d'animaux : Souris transgénique *Abcb4*^{-/-} sur fond FVB/n (également appelé *Mdr2*^{-/-}), modèle murin le mieux établi de cholangite sclérosante primitive.

Souris transgénique *Abcb4*^{-/-} x *Vdr*^{-/-} sur fond FVB/n, modèle murin de cholangite sclérosante développé dans notre laboratoire, donc les résultats préliminaires montrent une accentuation des lésions de CSP.

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 180 souris pour une durée maximale de 3 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé tout en respectant les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrits au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Au cours de ce projet, un objectif de réduction du nombre des animaux engagés sera poursuivi avec insistance de par l'analyse des données générées en continue.

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

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et inter-groupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et ne permettant pas de tirer des conclusions.

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

2666- Les Rétinopathies Pigmentaires (RP) touchent environ une personne sur 4 000 dans les pays occidentaux, et se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet puis à cône, entraînant une perte progressive de la vision puis une cécité. Aucun traitement efficace n'est disponible à ce jour. Le but de notre étude est de pouvoir proposer une solution thérapeutique aux patients atteints de RP afin en prévenant l'évolution de la maladie.

Dans des études que nous venons de mener, l'équipe a identifié et isolé une molécule d'une plante médicinale qui présente un fort potentiel thérapeutique sur le processus de dégénérescence secondaire des photorécepteurs à cône. Cette molécule a été nommée « Geralexin ».

Afin de vérifier son efficacité in vivo, nous allons administrer cette molécule en sous rétinien à un modèle animal de rétinite pigmentaire très utilisé par la communauté scientifique, la souris *rd1*. Les injections auront lieu sur des animaux âgés de 15 jours ; ils seront ensuite euthanasiés à 21 jours et les yeux prélevés pour les études histologiques nécessaires à ce projet. Trois groupes de 15 animaux seront analysés dans cette étude. Au préalable, nous vérifierons la non toxicité de la Geralexin sur 7 animaux sauvages (*C3Hwt/wt*). Au total 52 animaux seront nécessaires à ce projet.

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

2667- La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée dans ses stades précoces par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de la fonctionnalité synaptique dans l'hippocampe, une zone cérébrale clé de la mémoire.

La MA s'accompagne d'une composante neuroinflammatoire majeure qui joue un rôle crucial dans la progression de la pathologie. Cette composante neuroinflammatoire est portée par l'activation de cellules gliales cérébrales, astrocytes et microglie, qui produisent de nombreux facteurs inflammatoires. Parmi ces facteurs, la prostaglandine E2 (PGE2) altère

spécifiquement le fonctionnement du réseau neuronal formé entre les cellules granulaires du gyrus dentelé et les neurones pyramidaux CA3 de l'hippocampe.

Nous proposons l'hypothèse que l'altération fonctionnelle de ce réseau spécifique se traduit par un déficit de mémoire et qu'il est possible de réverser ce déficit par une approche interventionniste visant à bloquer la voie de signalisation cellulaire activée par PGE2. Pour ce faire nous testerons la mémoire épisodique, une forme de mémoire altérée chez les patients atteints de la MA et modélisée chez des modèles murins de cette pathologie.

Le projet général combine une analyse électrophysiologique, immunohistochimique et une analyse comportementale (le projet général fait l'objet de deux saisines). La partie du projet décrite ici utilise des souris témoins et un modèle murin de la MA. Les conséquences comportementales de la manipulation pharmacologique et/ou virale de la voie de signalisation activée par PGE2 sera réalisée sur les deux souches de souris. Un total de 135 animaux sera utilisé pour ce projet.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises: (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles électrophysiologiques afin de réduire le nombre total (réduction); (2) Les protocoles comportementaux seront suivis par des analyses immunohistochimiques afin de réduire et d'optimiser l'utilisation des animaux (réduction et raffinement) et (3) La souris constitue un modèle éprouvé pour l'étude du fonctionnement de réseaux neuronaux et permet de corrélérer ce fonctionnement à des propriétés cognitives. A ce jour, les seuls modèles animaux de la MA sont des modèles murins transgéniques et l'analyse comportementale nécessite de travailler sur l'animal entier (remplacement). Le bien être de l'animal sera pris en compte tout au long de sa vie et toute douleur générée par la chirurgie stéréotaxique sera soulagée par des molécules adaptées.

2668- Les réglementations internationales imposent qu'une évaluation de la toxicité des produits soit faite chez l'animal avant leur première administration chez l'homme et/ou leur mise sur le marché.

Cependant près de 50% des molécules mises en développement échouent pour des raisons de toxicité, souvent découvertes tardivement. Les principales caractéristiques de toxicité sont retrouvées sur le foie, les systèmes cardio-vasculaire, endocrinien et nerveux, ainsi qu'à l'échelle génétique pour laquelle on parle de génotoxicité. Plus rarement peuvent être observées des toxicités sur le rein, la peau ou les organes reproducteurs. Enfin, des allergies ou des phénomènes d'immunotoxicité peuvent également être mis en évidence.

Il s'avère donc nécessaire de développer une approche précoce permettant d'alerter au plus tôt sur les effets toxiques d'un candidat médicament.

Des approches alternatives ont été mises en place comme par exemple l'étude du potentiel génotoxique par des logiciels dédiés *in silico*, ou la culture de cellules ou d'organes *in vitro*. Si ces approches permettent de faire un premier tri des molécules, elles ne permettent pas de se substituer entièrement aux études sur les animaux. Des études spécifiques menées chez l'animal restent incontournables lorsqu'il s'agit d'études de recherche de dose toxique, ou de la recherche de biomarqueurs de toxicité. En effet, la détection précoce de la toxicité permet d'arrêter le développement d'une molécule avant des études de toxicologie réglementaire coûteuses d'un point de vue éthique et économique. Enfin, des biomarqueurs mis en place chez l'animal pourront être suivis chez l'homme lors des essais de phase I permettant ainsi de mieux appréhender la tolérance du produit.

Le présent projet concerne les études *in vivo* réalisées à un stade précoce du développement de nouvelles molécules et permettant d'anticiper la toxicité de ces candidats médicaments dans des modèles appropriés.

Le contenu de ces études intègre les impératifs éthiques tels que les modalités d'administration et de prélèvement, l'hébergement et l'enrichissement du milieu spécifique pour chaque espèce étudiée ainsi que la définition des critères d'arrêt anticipés des études.

Le nombre maximum d'animaux utilisé sur une période de 5 ans est de 7800 souris et de 5400 rats.

2669- Ce projet a pour but de caractériser par imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) la fibrose interstitielle dans le muscle squelettique au cours des maladies neuromusculaires.

Le processus fibrotique fait partie de la physiopathologie dans un certain nombre de myopathies, dont la dystrophie de Duchenne.

Les souris mdx sont le modèle murin de la dystrophie de Duchenne (DMD), l'une des formes les plus graves et les plus courantes de myopathies d'origine génétique.

Les souris mdx, comme les patients atteints de la DMD, sont porteuses de mutations dans le gène de la dystrophine qui conduisent à l'absence de la protéine en particulier dans les muscles squelettiques. Cette absence est responsable de la dégénérescence primitive du tissu musculaire. Le tissu musculaire dégénéré est progressivement remplacé par de la graisse et/ou du tissu conjonctif dont les dépôts excessifs de collagène forment la fibrose.

La fibrose musculaire est un aspect particulièrement important des dystrophies musculaires dans la mesure où elle conditionne largement les capacités contractiles des muscles. Par ailleurs, elle est le seul paramètre pathologique à avoir une corrélation significative avec le pronostic des patients, comme l'âge de perte de la marche.

Les souris mdx présentent une meilleure régénérescence musculaire et un niveau moins élevé de fibrose musculaire comparé aux patients atteints de DMD. Cependant, la fibrose musculaire peut être accentuée chez la souris mdx de façon contrôlée par injections locales de cytokines pro-fibrotiques, comme le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor beta-1).

A ce jour, l'évaluation de la fibrose musculaire est faite à partir de l'analyse histologique de biopsies musculaires. Le développement d'outils pour l'évaluation non-invasive et atraumatique de la fibrose musculaire est d'une importance

majeure, tant pour le suivi des patients que pour les études précliniques sur des modèles animaux. Ces outils permettront des études longitudinales sur les effets de possibles thérapies pour contrôler le développement de la fibrose musculaire.

L'objectif principal de ce projet est de développer des outils de RMN pour une évaluation atraumatique de la fibrose musculaire in vivo. Pour disposer d'un modèle cliniquement pertinent, avec des niveaux de fibrose musculaire chez les souris mdx similaires à ceux observés dans les patients DMD, les souris seront traitées par TGF- β 1.

Un total de 470 souris (entre mdx et contrôles normaux) est prévu pour ce projet, à être développé pendant 5 ans. Ce nombre de souris a été défini en appliquant la règle des 3R : réduire, raffiner, et remplacer.

La réduction du nombre d'animaux est assurée par la minimalisation de la variabilité entre les individus des groupes, pour ce qui concerne l'âge, les variations hormonales (souris mâles) et les variations sanitaires (un seul fournisseur pour chaque lignée).

Le raffinement avant l'expérimentation sera fait par l'enrichissement de l'environnement et par l'élevage des souris en groupes, selon les portées. En plus, le projet a comme méthode principale la RMN in vivo, une méthode non invasive et atraumatique. Le remplacement des modèles animaux n'est pas encore possible pour les études dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique.

2670- Nous avons identifié que les calpaïnes, des protéases activées par le calcium et leur inhibiteur la calpastatine jouent des rôles importants dans la progression du cancer et notamment le mélanome. Nous avons récemment créé un modèle murin surexprimant la calpastatine uniquement en extracellulaire, capable de diminuer l'angiogenèse (vascularisation de la tumeur) et d'augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale, et donc de protéger contre le développement des tumeurs de type mélanome.

Nous reprendrons exactement un modèle préalablement validé de mélanome murin, basé sur l'injection de cellules de mélanome sous-cutanée.

Ce modèle est optimisé selon la règle des 3R (reduce, replace, refine). En effet, le modèle in vivo est indispensable car il permet d'analyser le comportement des cellules tumorales (croissance) et la réponse immunitaire ainsi que l'angiogenèse.

Le nombre de souris sera réduit au minimum à savoir 10 animaux par groupe (contrôles et transgéniques surexprimant la calpastatine) afin d'étudier d'une part la croissance, l'inflammation et la vascularisation des tumeurs (sacrifice à J+15) et la survie (soit 40 animaux au total). Si ces études sont probantes, nous étudierons dans un second temps les métastases disséminées à partir de l'injection de cellules tumorales en intraveineuse. Il n'y a pas d'autre modèle équivalent disponible et chaque animal sera utilisé pour plusieurs analyses (raffinement).

Nous limiterons donc l'étude à 60 souris.

Les points limites seront ceux déjà mis en vigueur dans l'animalerie et adaptés à un modèle d'injection de mélanome :

- signes de souffrance manifeste
- perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids initial
- masse tumorale « excessive » ou supérieure à 25 mm de diamètre
- Ulcération de la tumeur
- Mutilations auto- ou hétéroinduites

Un protocole similaire a déjà été réalisé dans l'animalerie et validé.

Le nombre de 10 animaux par groupe est issu notamment de l'expérience avec ce type de modèle. Un nombre inférieur imposerait de refaire l'expérience avec potentiellement plus d'animaux au final.

Nous limiterons donc l'étude à 40 souris seulement, et éventuellement 60 pour l'étude des métastases uniquement si les modèles précédents sont contributifs.

2671- Le but de ce projet est d'évaluation de l'effet thérapeutique du Paclitaxel/Taxol sur la progression de la cardiomyopathie et des arythmies cardiaque 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 (apparition des symptômes plus précoces que chez les femelles) 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 (il n'y a pas de modèle in vitro pour étudier cette problématique) pour tester l'administration du Paclitaxel/Taxol afin de déterminer ses effets thérapeutiques sur la progression du phénotype cardiaque et musculaire dans le contexte de cette pathologie («Replace»).

Le nombre d'animaux inclus dans ce protocole est 12. 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 («Reduce»). Afin de minimiser les interventions sur les animaux au cours du traitement, l'administration du Paclitaxel/Taxol sera effectuée à l'aide d'injections intra-péritonéales. La méthode d'évaluation de l'effet thérapeutique sur la fonction cardiaque est non invasive et nécessite uniquement une anesthésie légère. Tous des animaux sont mis à mort à la fin du protocole. La mise à mort est indispensable pour évaluer ex-vivo l'expression et la localisation de la connexin 43 (au niveau des disques intercalaires entre cardiomyocytes) par histologie et biologie moléculaire. 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 (« Refine »).

2672- L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des formulations d'extraits naturels (la dénomination de ces extraits est sujette à accord de confidentialité) permettant de réduire des facteurs de risques associés à certains troubles de santé liés au métabolisme. Ainsi, le principal objectif de la présente étude est d'évaluer la biodisponibilité plasmatique de métabolites présents dans les différents extraits chez un modèle de souris sauvages. A terme, les données obtenues au cours de l'étude devraient permettre à la société cliente de commercialiser des extraits naturels améliorant chez l'homme un mauvais état de santé ou d'autres anomalies liées au métabolisme.

Les 12 formulations à tester contiennent 10 métabolites d'intérêt identiques, en concentrations différentes dont le client souhaite connaître la biodisponibilité après administration orale.

La biodisponibilité sera étudiée sur la base des concentrations mesurées de chaque métabolite dans du plasma prélevé à 6 temps différents après administration des formulations (T0.25h, T0.5h, T0.75h, T1h, T2h et T8h) à des souris C57Bl/6. Compte tenu des volumes plasmatiques nécessaires au dosage des 10 métabolites d'intérêt (au moins 250 microlitres de plasma) il sera nécessaire d'utiliser un groupe de souris pour chacun des temps post-administration (n=4 par temps) et pour chacune des formulations. L'étude complète nécessitera ainsi l'utilisation d'un total de 288 souris : 12 formulations x 6 points de mesure x 4 animaux par point de mesure).

Le protocole expérimental a été conçu en respect de la règle des 3Rs:

- Raffinement: Le protocole a été conçu pour limiter au maximum tout stress induit aux animaux (périodes d'acclimatation et d'habituation aux procédures d'administration). Les animaux seront hébergés en cages collectives afin de maintenir le caractère social de l'espèce souris. Par ailleurs, les cages seront enrichies par l'ajout d'igloo et de matériaux de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de résultats préliminaires obtenus lors d'une étude antérieure utilisant le même modèle et le même protocole sur des formulations similaires. Le nombre de 4 animaux par point de mesure a été défini comme le nombre adéquat d'animaux à utiliser afin de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe, à ce jour, aucune méthode de substitution *in vitro* permettant l'étude de la biodisponibilité de composés naturels dans le plasma. Le modèle animal est un modèle souris sain (souche C57Bl/6).

2673- L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines ou oxaliplatine) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein ou colorectal, recevant respectivement des anthracyclines ou de l'oxaliplatine. De plus, l'effet négatif de la mutation est retrouvée simplement chez les patients que ont les récepteurs TLR3 et TLR4 fonctionnel en suggérant l'importance de l'axe TLRs/FPR1 pour l'efficacité soit de la chimiothérapie soit de l'activation de la mort cellulaire immunogène. Le but de ce projet est de compenser les effets provoqués par l'absence des gènes FPR1 et/ou TLR3 et/ou TLR4. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Pour se faire, nous projetons d'utiliser des souris C57Bl/6 (n. 960) et aussi des souris transgéniques C57Bl/6 Fpr1-/- (n.960) et C57Bl/6 Fpr1+/- (n.1020), accessible dans le commerce et qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Ce projet se dessine sur 3 ans et implique des études de croissance tumorale. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Le nombre d'animaux par groupe sera de 5 et les expériences seront effectuées au maximum 2 fois pour permettre une analyse statistique robuste des effets observés. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet vise à une compensation des défauts associés à la perte de fonction de FPR1, un facteur pronostique négatif pour la réponse aux traitements anti-carcéaux à base d'anthracyclines et oxaliplatine, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de cancer du sein ou colorectal. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire aux cancers pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

2674- L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines ou oxaliplatine) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein ou colorectal, recevant respectivement des anthracyclines ou de l'oxaliplatine. De plus, l'effet négatif de la mutation est retrouvée simplement chez les patients qui ont un récepteur TLR4 fonctionnel en suggérant l'importance de l'axe TLR4/FPR1 pour l'efficacité soit de la chimiothérapie soit de l'activation de la mort cellulaire immunogène. Le but de ce projet est de caractériser la fonction de ce polymorphisme perte de fonction in vivo. Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes in vitro. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris C57Bl/6 (n. 720) et aussi des souris transgéniques C57Bl/6 TIB6.B10ScN-Tlr4lps-del/JthJ (nommé Tlr4-/- par la suite) (n.360) et C57Bl/6 Fpr1-/- (n.360), accessible dans le commerce et qui sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales. Ce projet se dessine sur 3 ans et implique des expériences de vaccination et croissance tumorales. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Pour la réalisation de cette étude, nous utiliserons des groupes de 5 souris C57Bl/6 WT ou Fpr1-/- ou Tlr4-/. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet vise à une meilleure compréhension de la fonction de FPR1, un facteur pronostique négatif pour la réponse aux traitements anti-carcéaux à base d'anthracyclines et oxaliplatine, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de cancer du sein ou colorectal. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire aux cancers pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

2675- L'altération de la fonction auditive au cours du vieillissement ou du traumatisme sonore implique différents mécanismes moléculaires responsables de la perte d'audition. Les protéines contenues dans le liquide de l'oreille interne pourraient apporter des éléments de compréhension sur ces altérations, voire de nouvelles pistes thérapeutiques, mais ce dernier est très difficile à prélever.

A ce jour il n'existe pas de système de prélèvement de liquide dédié et validé pour un usage chez l'Homme permettant d'explorer le fonctionnement de l'oreille interne. Les travaux du laboratoire ont permis la mise au point d'un tel instrument. Le présent projet vise à faire la preuve de son efficacité dans un modèle animal, avant de proposer son utilisation chez les patients malentendants.

L'utilisation de 76 rats Sprague-Dawley répartis en groupes naïfs ou de modèles de surdité permettra de valider l'approche d'échantillonnage de ce liquide, et d'analyser les protéines qu'il contient dans les groupes contrôles ou malades.

Aucun modèle alternatif ne permet à ce jour de remplacer l'utilisation d'animaux. Tous les efforts sont faits de manière à minimiser le nombre d'animaux nécessaires tout en assurant de pouvoir conclure significativement à l'issue du projet. La mise en place d'une surveillance resserrée et au besoin de traitements antalgiques adaptés garantira le bien être de l'animal tout au long de l'expérimentation.

Le succès de cette étude ouvre la voie à une étude clinique chez l'Homme en utilisant notre instrument chez les patients recevant un implant cochléaire.

2676- La greffe de cellules souches hématopoïétiques constitue la principale thérapie curatrice dans le cadre de la prise en charge des hémopathies malignes. Elle se complique dans près de 40% des cas, avec une destruction des tissus des patients par les cellules du donneur. C'est la « réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GvHDA) ». Celle-ci est la principale cause de décès après greffe. Bien que différents facteurs de risques soient connus, il est impossible de prédire avec certitude sa survenue pour un patient donné. L'atteinte des cellules intestinales par la chimiothérapie favorise le passage de produits microbiens dans le sang, responsable de l'activation des cellules immunitaires du donneur. Ces cellules activées reconnaissent les tissus du patient comme étrangers et vont les détruire, à l'origine de la gravité de la GvHDA. L'ensemble de l'intestin est tapissé de mucus qui est une barrière protectrice. Le renforcement de la barrière de mucus par délivrance hétérologue de domaines des mucines gélifiantes ou le renforcement de la barrière intestinale par des pharmaco-nutriments limiterait le passage de produits microbiens ou/et micro-organismes et la survenue d'une GvHDA. Notre projet vise à proposer une nouvelle approche en renforçant l'effet « barrière » de l'intestin afin de limiter le développement et la sévérité de la GvHDA.

Remplacement : L'étude de l'influence de l'atteinte intestinale avant la greffe et l'effet bénéfique du renforcement de celle-ci sur la survenue et la sévérité de la GvHDa ne peuvent être menées que dans un modèle physiopathologique intégré.

Réduction et Raffinement : Ce projet nécessitera 12 souris pour mettre en place un modèle de chimiothérapie et 606 souris pour l'étude de l'effet bénéfique du pharmaco-nutriment candidat (glucagon like peptide 2 / GLP-2) et d'un mucus modifié. L'ensemble du projet nécessitera 618 souris. Les souris seront hébergées dans une animalerie exempte de tout organisme pathogène et auront une surveillance quotidienne à partir du début des protocoles. Toute souris montrant un signe de souffrance ou ayant une perte de masse corporelle >20 % par rapport à la masse initiale sera immédiatement euthanasiée.

2677- La fibrose rénale est une conséquence de la plupart des affections rénales chroniques, aboutissant à l'insuffisance rénale terminale. La fibrose rénale est due à une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme rénal. Elle survient à la suite d'une lésion rénale, aiguë ou chronique, déstabilisant l'équilibre complexe entre cellules et protéines profibrosantes et antifibrosantes. Quelle que soit l'origine de l'agression tissulaire initiale, les lésions de fibrose s'aggravent en faveur d'un processus final commun responsable de la progression de la maladie. Les mécanismes précis régulant l'apparition de la fibrose ne sont qu'incomplètement élucidés à ce jour et il n'existe pas, pour l'instant, de traitement efficace de la fibrose permettant le retour à un parenchyme rénal normalement fonctionnel une fois que la maladie est installée. Parmi les différents facteurs favorisant le développement d'une fibrose rénale, l'ischémie-reperfusion (IR) ainsi que l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs tels que la cyclosporine (après une greffe d'organe par exemple) jouent un rôle important. L'IR rénale se caractérise par une interruption du flux sanguin au niveau rénal puis une reperfusion. Ce phénomène peut se présenter en clinique lors d'un infarctus du myocarde, d'une occlusion des vaisseaux rénaux, d'un choc septique ou pendant une chirurgie vasculaire ou une transplantation rénale. Dans le cadre d'une chirurgie pour transplantation, il a été démontré que l'utilisation d'immunosuppresseurs aggrave la progression de pathologies rénales préexistantes et induit le développement de la fibrose, conduisant au cours du temps à une insuffisance rénale.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la fibrose et sur la perte de fonction rénale. Actuellement, les méthodes alternatives permettant une telle évaluation sont inexistantes et le recours à l'expérimentation animale reste incontournable. La fibrose rénale sera induite chez le rat par une néphrectomie unilatérale (N), une ischémie-reperfusion sur le rein restant (IR) et une administration journalière de Cyclosporine (C) pendant 28 jours (modèle NIRC).

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 900 rats à raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs). Le nombre de groupes sera fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Nous avons établi une stratégie d'expérimentation permettant de mesurer la fonction rénale par méthode non invasive grâce à une récolte urinaire en cage métabolique individuelle, suivi d'un prélèvement de sang. Cette méthode permet de réduire le nombre d'animaux utilisés, car nous pourrions mesurer la fonction rénale de chaque animal pendant toute la durée de l'expérimentation sans recours à une mise à mort à différents temps. En accord avec la règle de réduction, ces prélèvements urinaires et sanguins nous permettront ainsi de mesurer des biomarqueurs d'intérêt pour cette pathologie et/ou d'en identifier de nouveaux pouvant prédire son évolution. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et de réaliser ce projet selon la règle des 3-R. De plus, les animaux seront hébergés en nombre de 2 ou 3 cage en fonction de leur poids et un enrichissement sera introduit dans chaque cage. Si un comportement atypique (prostration, agressivité, perte de poids, ...), l'animal sera isolé pendant 2 ou 3 jours, réhydraté et observé.

2678- Outre les troubles cognitifs sévères, la maladie d'Alzheimer se caractérise par des dégénérescences neuro-fibrillaires et des plaques amyloïdes dans le cerveau. Les plaques amyloïdes sont dues à l'agrégation d'une forme longue de protéines dites bêta amyloïdes provenant d'un clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde, l'APP (pour amyloid precursor protein). Les fonctions de l'APP restent, aujourd'hui encore, mal connues. Pour les étudier, on utilise des souris chez qui l'APP n'existe pas; on les dit knocked out (KO) pour l'APP. Pourquoi développer un modèle similaire chez le Rat ? Contrairement à ce qui peut être fait chez la souris, les possibilités de tester les capacités d'apprentissage et de mémorisation chez le Rat sont plus diversifiées, plus faciles à mettre en œuvre. Qui plus est, au moins un test considéré comme particulièrement pertinent en matière d'évaluation des capacités d'apprentissage et de mémorisation, notamment spatiale, mais aussi suffisamment documenté dans la littérature pour en faire un incontournable, est réalisé dans un milieu aquatique ; il s'agit du test de la piscine de Morris. Si ce milieu fait partie de l'écosystème du rat, il n'en va pas de même chez la souris, chez qui il est beaucoup plus anxiogène. Enfin, pour un certain nombre d'examen neurochimiques, les approches sont d'autant plus fiables, voire faisables, que la quantité de tissu dont on dispose est généreuse. Or le cerveau du rat est plus volumineux que celui de la souris. Notre projet vise à phénotyper le comportement de rats KO pour l'APP. Nous disposerons de rats dits 'wild type' (témoins non OGM), d'hétérozygotes et d'homozygotes. Le phénotypage sera fait à 3 âges (2 mois, 12 mois et 18 mois). Le nombre total de rat est de 108 avec pour chaque âge, 12 rats hétérozygotes, 12 rats homozygotes pour le gène APP et 12 rats wild type. Soit au total 3x12 rats hétérozygotes, 3x12 rats homozygotes et 3x12 rats wild type. Après acclimatation aux conditions d'élevage au laboratoire (10 jours), nous évaluerons successivement, i) l'anxiété dans un labyrinthe en croix surélevé, ii) l'activité locomotrice en cage d'élevage sur 24h (nourriture et eau ad libitum), iii) la locomotion dans un champ ouvert, iv) la coordination sensori-motrice avec le test de la barre, v) la mémoire spatiale en piscine de Morris et vi) la coopération entre deux systèmes de mémoire, la mémoire spatiale et la mémoire procédurale dans le labyrinthe en double-H mis au point et validé au laboratoire. L'ensemble des tests est compatible avec les trois âges étudiés. L'analyse statistique des données utilisera essentiellement une ANOVA à 1 ou plusieurs facteurs et des tests post-hoc (Newman-Keuls) si pertinents. Au

terme des tests, les rats seront transférés à notre partenaire pour des études biochimiques. Les conditions d'élevage et les expériences comportementales prendront en compte la règle des '3R' : le 1er 'R', 'réduire' le nombre d'animaux avec 12 rats/groupe pour une puissance statistique suffisante à l'interprétation des données et le 2e 'R', 'raffiner' soit limiter au maximum le stress et l'anxiété des animaux par : i) habituation à l'expérimentateur/manipulation, ii) habituation aux procédures et dispositifs dans les tests de comportement et iii) enrichissement des cages (bâton à ronger).

2679- Certaines pathologies chez l'homme nécessitent des traitements médicaux à long terme (6 mois ou plus). Les études de cancérogenèse chez le rongeur ont été développées pour prédire le risque qu'un produit pharmaceutique/chimique induise des tumeurs chez l'homme lorsqu'il est exposé à ce produit sur de longues périodes. Elles sont réalisées lorsque les données *in vitro* de génotoxicité ne mettent pas en évidence un effet mutagène potentiel du composé ou lorsqu'il y a un doute sur l'effet cancérogène lié à la structure du produit à tester. Il n'existe pas d'alternative *in vitro* pour le moment.

Ce projet se résume en l'administration répétée (souvent quotidiennement) d'un produit pharmaceutique/chimique chez le rongeur pendant une durée allant de 6 mois (modèles spécifiques de souris transgéniques, Tg) à 18 (souris) ou 24 mois (rat ou souris non transgéniques). La voie d'administration est celle utilisée chez l'homme (essentiellement orale, parfois en mélange avec la nourriture, par application dermale, sous cutanée, etc).

L'animal choisi est un mammifère rongeur, espèce recommandée dans les lignes directrices pour ce type d'étude car la durée de vie de cette espèce est compatible avec une exposition au produit sur une très longue période (environ 2 ans chez le rongeur), permettant d'évaluer l'effet possible du produit sur l'apparition de tumeurs sur un animal âgé. A ces fins environ une quarantaine d'organes et toutes les tumeurs observées sont examinées par un pathologiste expérimenté pour discriminer les tumeurs spontanées des tumeurs induites sur la base d'une comparaison avec les animaux contrôles, en utilisant des tests statistiques exigeant un nombre minimal d'animaux en fin d'étude, et de données historiques.

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet peut être estimé à un total de 7200 rongeurs sur 5 années (2700 rats, 2700 souris, 1800 souris Tg). Ce chiffre repose sur la nécessité d'obtenir des résultats représentatifs et exploitables statistiquement en procédant à toutes les analyses nécessaires sur un nombre d'animaux optimisé pour évaluer l'effet cancérogène d'un composé pharmaceutique ou chimique. Le nombre minimal permet d'identifier l'ensemble des organes par microscopie afin de détecter la survenue de cancers. A minima, trois groupes seront traités avec le produit en doses croissantes et seront comparés avec un groupe contrôle, chacun contenant généralement au moins 50 mâles et 50 femelles (études 18 ou 24 mois) ou 25 mâles et 25 femelles (études 6 mois Tg), comme recommandé par les lignes directrices internationales spécifiques à ce type d'études.

L'hébergement des animaux se fait conformément à la Directive 2010/63 avec enrichissement. Toutefois, l'hébergement individuel peut être retenu lorsque le schéma d'administration l'y oblige (risque de contamination des animaux par voie dermale par exemple).

Les animaux sont observés pendant toute la période de l'étude pour détecter l'apparition de masses. Des analyses hématologiques et biochimiques sont réalisées en fin ou en cours d'étude. Des prélèvements sanguins sur des animaux satellites permettent d'établir un profil toxicocinétique afin de relier les effets chez l'animal avec les données d'exposition humaine obtenues dans les essais cliniques. Des examens ophtalmologiques peuvent aussi être réalisés. Après euthanasie, un examen histopathologique qui représente la partie la plus importante de l'étude est fait pour détecter, identifier et comparer les lésions tumorales. Le développement de masses trop important (gênant l'administration, la vie normale de l'animal, cas d'ulcération) ainsi que la dégradation clinique des animaux font partie des critères de sacrifice prématuré. La survie par groupe est sous surveillance fréquente car elle peut impacter sur la validité de l'étude (exemple: diposer entre 20 et 30 animaux/groupe entre les semaines 80-90).

Le design des études peut être soumis à l'examen d'autorités (FDA par exemple).

2680- L'infection avec le parasite *Toxoplasma gondii* constitue un facteur de risque majeur pendant la grossesse.

(1) Lors d'une séroconversion d'une femme enceinte, indicative d'une infection, une amniocentèse doit confirmer ou infirmer l'infection du fœtus. L'amplification de séquences génomiques de *Toxoplasma gondii* par la biologie moléculaire (PCR) est aujourd'hui la technique principale pour le dépistage d'une transmission materno-foetale, grâce à sa spécificité et rapidité. Néanmoins, en cas de positivité, une inoculation chez la souris est effectuée, pour confirmer la transmission de parasites vivants, car la PCR amplifierait aussi des fragments isolés de parasites. L'apparition d'anticorps anti-T. *gondii* confirme alors l'infection foetale. Un tel diagnostic n'est possible que dans un modèle animal. L'inoculation de prélèvements cliniques est aussi pratiquée pour les biopsies en cas de suspicion d'une trichinellose (assez rare). Cette inoculation est effectuée en parallèle avec une PCR, car la sensibilité est ainsi considérablement augmentée.

(2) Pour le travail au sein de notre laboratoire diagnostique, nous avons besoin de parasites vivants (pour le test de référence en diagnostic, notre laboratoire est centre de référence national (CNR) Toxoplasmose ou pour les tests *in vitro* (parasites entiers pour confectionner les lames pour l'immuno fluorescence, préparation d'antigène parasitaire pour des techniques immunologiques etc.). Les protocoles cliniques exigent l'utilisation de toxoplasmes isolés de souris. Pour la procédure (1), le nombre maximale de souris utilisées est de 1040, pour la procédure (2) de 80 souris pour les 5 ans du projet. Malgré le remplacement d'une grande partie de ce diagnostic par des techniques *in vitro*, les expérimentations animales restent nécessaires pour assurer un diagnostic de bonne qualité pour les patients, conformément aux protocoles en vigueur. Par l'optimisation des protocoles de ces expériences et l'adaptation au besoin réelle du diagnostic, le nombre de souris utilisées a

pu avoir baissé au strict minimum. La souffrance des animaux a été également considérablement diminuée par l'utilisation d'un analgésique et l'observation des animaux plusieurs fois par jour afin de terminer l'expérience le plus tôt possible.

2681- Le vieillissement de la population et le besoin de thérapies toujours plus efficaces poussent à développer de nouveaux traitements médicaux. Certains traitements sont basés sur de nouvelles molécules ou combinaison de molécules mais aussi sur des thérapies géniques. Lorsqu'un traitement médicamenteux semble prometteur, il entre en phase de recherche préclinique, pendant laquelle il est d'abord testé *in vitro* (par exemple sur des cellules) avant d'être testé *in vivo*, sur des animaux de laboratoire. Cette procédure indispensable selon la loi européenne en vigueur permet notamment d'assurer la sécurité des premiers essais sur l'homme et d'évaluer l'efficacité des nouveaux traitements. Un certain nombre d'études nécessite de mesurer, sur des rongeurs de laboratoires (en général souris et rats), l'activité et les paramètres physiologiques de ces animaux, ceci de manière précise et sur de longues périodes expérimentales. Pour fiabiliser les résultats, comme pour répondre à des exigences éthiques, ces mesures gagnent à être réalisées dans des conditions de vie « normale » des animaux, c'est à dire sur des animaux non contraints, libres de leurs mouvements et hébergés en groupes et non pas isolés dans des cages individuelles. Les biais potentiellement induits par l'isolement des sujets évalués sont significatifs et atténuent la fiabilité des évaluations sur la durée. Des solutions commerciales partielles sont actuellement disponibles, mais elles n'offrent malheureusement pas les performances et la flexibilité requises. C'est dans ce cadre que plusieurs partenaires académiques et industriels ont décidé de développer ensemble une instrumentation innovante pour effectuer, *in vivo*, la mesure de paramètres tels que l'activité et la localisation instantanée des animaux. Ces mesures permettent d'une part d'évaluer l'état physiologique de l'animal mais aussi de quantifier différents indicateurs d'activité: distance parcourue, activité diurne, activité nocturne, vivacité, sociabilité. Notre solution, composée d'un implant inséré dans l'animal et d'un détecteur extérieur à sa cage, allie un plus grand respect de l'animal et une meilleure fiabilité des résultats par rapport aux solutions existantes. Un traitement antalgique systématique sera administré aux animaux après implantation du dispositif. La douleur sera évaluée grâce à une échelle standardisée deux fois par jour pendant la première semaine.

Ce projet vise à valider une première version de puce développée pour le rat afin de vérifier son innocuité pour l'animal et sa pertinence métrologique. Cette validation sera menée sur 10 rats Sprague-Dawley. Ce nombre d'animaux a été optimisé afin de tenir compte de la règle des 3R. L'étude ne nécessite pas de modèle statistique à ce stade.

2682- L'objectif de ce projet est d'évaluer les possibles effets toxiques locaux suite à l'administration du produit test par voie topique. La voie topique sélectionnée peut être la voie d'exposition clinique pour un produit pharmaceutique ou vétérinaire (sécurité d'emploi pour le patient), ou bien une voie de contact possible pour les produits chimiques et vétérinaire (sécurité d'emploi pour le manipulateur). Le but de ce projet est donc d'anticiper les effets locaux pouvant être observés après un contact intentionnel (produit pharmaceutique/vétérinaire ou dispositif médical) ou inopiné (produit chimique/vétérinaire). Ce projet se résume par l'administration topique du produit test par voie cutanée, oculaire, vaginale ou rectale chez le lapin, ou pénienne chez le cobaye. La voie d'administration est choisie en fonction des caractéristiques d'exposition prévue en clinique. Les voies cutanées et oculaire sont les seules à être mises en oeuvre pour l'évaluation de la sécurité du manipulateur (produits chimiques/vétérinaire). En ce qui concerne les durées de traitements, elle consistent en une seule application pour l'évaluation du risque chez le manipulateur. Pour l'évaluation de produits pharmaceutiques/vétérinaires et dispositifs médicaux, la durée de traitement sera fonction du schéma posologique visé en clinique.

Pour l'évaluation de la tolérance cutanée de produits pharmaceutiques/vétérinaires, il est également possible d'inclure une phase d'abrasion mécanique de la peau avant le traitement afin d'évaluer les effets toxiques locaux possible après application du produit test sur une peau déjà lésée lorsque le produit d'étude est destiné à être appliqué sur une peau lésée.

L'espèce animale choisie est le lapin, couramment utilisé pour ce type d'essai du fait de sa sensibilité et permettant une évaluation facilitée des réactions locales chez les individus albinos. Le cobaye est choisi dans l'évaluation des réactions locales après administration par voie pénienne uniquement. Ces espèces sont citées comme espèces de choix dans les lignes directrices OCDE404, OCDE405 et ISO10993-10.

Le lapin New Zealand white et le cobaye Dunkin Hartley sont habituellement acceptés et autorisés par les autorités réglementaires.

Des méthodes alternatives validées existent pour l'évaluation de la toxicité locale après application unique par voie cutanée (peau saine) ou oculaire. Pour autant, dans le cas où le produit d'étude n'est pas chimiquement compatible avec le protocole d'essai *in vitro* (interaction avec réactifs de l'essai *in vitro*) ou bien en cas de résultat équivoque à l'issue d'un essai *in vitro*, un essai *in vivo* devra être mis en oeuvre. De même, certaines autorités n'acceptent pas encore pleinement les méthodes alternatives et peuvent demander à ce qu'un essai *in vivo* soit réalisé.

Concernant les applications cutanées et oculaire après exposition répétée, les applications vaginales, rectales ou pénienne, aucun modèle *in vitro* validé n'est disponible à ce jour. De même, il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'évaluer la toxicité locale sur peau lésée.

A ce titre, lorsqu'aucune méthode alternative validée n'est disponible, la mise en oeuvre de ce projet est justifiée par les lignes directrices OCDE404, OCDE405, ISO 10993-10 et CPMP/SWP/2145/00 afin de garantir la sécurité d'utilisation chez l'homme ou l'animal.

Le nombre d'animaux est fixé à 3 à 6 du même sexe par groupe et constitue un nombre minimal permettant d'avoir une représentation moyenne des réponses locales non influencées par la variabilité individuelle. Les évaluations après exposition unique comporteront 3 animaux par lot, tandis que les évaluation après exposition répétée comporteront jusqu'à 6 animaux par lot afin de pouvoir réaliser une phase de réversibilité si nécessaire.

En considérant un maximum de 4 groupes de 6 cobayes (voie péniennne uniquement), 240 cobayes pourront être utilisés sur une durée de 5 ans.

En considérant un maximum de 1 groupe de 3 lapins (exposition aigue, sécurité manipulateur), 450 lapins pourront être utilisés sur une durée de 5 ans.

En considérant un maximum de 4 groupes de 6 lapins (exposition aigue/répétée, sécurité patient), 600 lapins pourront être utilisés sur une durée de 5 ans.

Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet peut donc être estimé à un total de 1050 lapins et 240 cobayes, soit 1290 animaux.

Le nombre d'animaux est défini à minima afin d'obtenir des résultats robustes et ainsi d'atteindre tous les objectifs de l'étude en procédant à toutes les analyses sur un nombre d'animaux optimisé pour évaluer la tolérance locale au site d'application. En vue de diminuer le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, il sera possible de réaliser l'évaluation de la tolérance oculaires aigue sur des lapins ayant déjà été utilisé pour l'évaluation la tolérance cutanée aigue à conditions qu'il n'y ait pas d'effet local significatif impactant le bien-être de l'animal à la fin de l'évaluation de la tolérance cutanée.

L'hébergement des lapins et des cobayes est effectué dans des cages conformes à la Directive 2010/63 avec enrichissement. Les cobayes seront hébergés en groupes, tandis que les lapins, de par leur incompatibilité liée à leur âge/sexe, seront hébergés individuellement. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

2683- L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie incurable à issue fatale, justifiant la recherche de nouveaux facteurs de risques et l'établissement d'une corrélation entre ces facteurs et la sévérité de la maladie et/ou de la survie. L'HTAP est associée à des modifications cardiorespiratoires importantes, caractérisées par une hyperventilation au repos et à l'effort qui semblerait découler d'une hypersensibilité aux modifications des gaz dans l'air inspiré, et par un dysfonctionnement de la balance autonome en défaveur du tonus parasympathique. L'objectif de cette étude est donc d'étudier les mécanismes des altérations respiratoires et autonomiques associées à l'HTAP et de déterminer s'ils peuvent constituer des facteurs de risques associés à la maladie.

De plus, l'HTAP est liée à des états de stress. Nous examinerons donc s'il existe un lien entre l'HTAP et le taux plasmatique de facteurs neurotrophiques (en particulier le Brain Derived Neurotrophic Factor ou BDNF), car il a été montré que ce taux est diminué chez les patients anxiodépressifs. Enfin, nous réaliserons des expériences afin de préciser si des groupes neuronaux spécifiques de régions centrales clés des réponses au stress (notamment les cellules hypothalamiques orexinergiques et sérotoninergiques bulbaires) sont impliqués dans les mécanismes à l'origine des altérations cardiorespiratoires caractéristiques de l'HTAP.

Ce travail de recherche devrait permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs et/ou cibles moléculaires au cours de la progression de l'HTAP.

Pour ce faire, nous devons travailler chez l'animal in vivo car nous avons besoin d'un système cardiorespiratoire fonctionnel. Nous travaillerons principalement chez le rat (et aussi pour quelques séries chez la souris génétiquement modifiée pour les récepteurs sérotoninergiques). Nous utiliserons 6 animaux dans chaque série (14 séries: 10 séries de rats et 4 séries de souris, donc 84 animaux), qui est le nombre minimal pour effectuer des statistiques satisfaisantes dans le cadre de ce projet. Dans chaque série, plusieurs procédures seront appliquées (enregistrement télémétriques cardiaques, prélèvements sanguins, analyse respiratoire, analyse de flux cardiaque et du volume pulmonaire) pour réduire le nombre de séries. Le milieu est enrichi avec au choix : lanières de papier Kraft, maisons en carton, tunnel en carton ou carré de coton compacté. L'observation de chaque animal sera effectuée 1 heure chaque demi-journée, pendant laquelle les animaux seront autorisés à interagir et seront manipulés par les expérimentateurs pour diminuer le stress de l'inconnu. Enfin, ils seront alors habitués à se placer dans les chambres plethysmographiques pour réduire également la peur de l'environnement nouveau.

Lors des procédures chirurgicales longues (télémétrie) nécessitant le réveil de l'animal, du métacam (anti-inflammatoire) sera donné dès le début de la procédure, ainsi que du carprofène dans l'eau du biberon avant et 2 jours après la procédure chirurgicale.

2684- L'objectif de ce projet est d'évaluer les possibles effets toxiques locaux suite à une ou plusieurs applications topiques d'un produit test sur la muqueuse buccale.

Ce projet se résume par l'administration topique du produit test dans les abajoues de hamsters. La voie, la fréquence de traitement, ainsi que la durée de la période de traitement sont choisies en fonction des caractéristiques d'expositions prévues chez l'homme.

L'espèce animale choisie est le hamster, couramment utilisé pour les essais de tolérance buccale. Les abajoues des hamsters sont suffisamment grandes pour permettre une application aisée du produit, de même qu'un contact prolongé du produit avec la muqueuse buccale, et réaliser des observations locales sans difficulté. Le hamster de Syrie est habituellement accepté et autorisé par les autorités réglementaires, tel que décrit dans la ligne directrice ISO 10993-10.

Des muqueuses buccales reconstruites sont disponibles pour permettre une évaluation in vitro. Pour autant, ces modèles de muqueuses orales/gingivales reconstruites font appel à des protocoles expérimentaux qui ne sont pas encore validés, qui ne permettent pas d'évaluation après expositions répétées, et qui ne sont pas encore acceptés réglementairement. D'un point de vue réglementaire, l'évaluation de la tolérance sur muqueuse buccale ne peut donc pas être réalisée in vitro à ce jour.

Conformément à l'ISO 10993-10 et la CPMP/SWP/2145/00 la réalisation de ce projet est indispensable afin de garantir la sécurité d'utilisation chez l'homme.

Le nombre d'animaux est fixé à 5 du même sexe par groupe et constitue un nombre minimal permettant d'avoir une représentation moyenne des réponses locales non influencé par la variabilité individuelle. Chaque animal est traité en bilatéral de manière à augmenter le nombre de données pour une concentration de produit test tout en gardant un nombre restreint d'animaux.

Le nombre totale d'animaux utilisés pour ce projet peut être estimé à un total de 2000 hamsters.

Le nombre d'animaux est défini à minima afin d'obtenir des résultats robustes et ainsi d'atteindre tous les objectifs de l'étude en procédant à toutes les analyses sur un nombre d'animaux optimisé pour évaluer la tolérance locale au site d'application.

Les animaux sont hébergés en groupe, dans des cages respectant les dimensions réglementaires, et en présence d'enrichissement environnemental. L'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter un inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance d'un animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptée.

2685- La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité non corrigeable chez les personnes âgées en occident. On n'en connaît pas les causes et on ne sait la guérir. Il en existe deux formes : atrophique et exsudative qui peuvent coexister. La forme exsudative correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux choroïdiens qui peuvent provoquer des hémorragies et la cécité. Les traitements existants (anti-VEGF, empêchant la formation de nouveaux vaisseaux) permettent de ralentir son évolution. Pour trouver de nouveaux traitements nous devons comprendre les mécanismes de la DMLA en général, et de la forme exsudative en particulier. Cette maladie, résultat d'une interaction complexe entre différents types cellulaires, ne peut être modélisée in vitro. Le syndrome d'apnée du sommeil (SAS) est une pathologie fréquente se caractérisant par la récurrence d'apnées durant le sommeil, induisant une hypoxie intermittente chronique (HIC). La forme la plus fréquente est le SAS obstructif, le plus souvent associé à une obésité. En raison de la prévalence de l'obésité en occident, l'incidence de cette pathologie est amenée à croître. L'HIC au cours du SAS a été associée à une néovascularisation (NV) anormale. Il a également été suggéré une association entre DMLA réfractaire aux anti-VEGF et SAS. Nous pensons que le SAS pourrait aggraver l'apparition de néovaisseaux choroïdiens (NVC) et modifier leur réponse aux anti-VEGF.

L'apparition de NVC peut être expérimentalement induite par photocoagulation par laser surdosé. La photocoagulation laser chez le rongeur est le modèle le plus utilisé pour «mimer» la DMLA exsudative. Afin d'étudier les mécanismes en amont et en aval de la NVC, nous soumettons nos modèles animaux à des impacts laser sous anesthésie générale afin de déclencher la NVC. D'un autre côté, pour mimer le SAS chaque animal sera placé dans une cage permettant de moduler les taux d'oxygène : les animaux seront soit placés dans des cages permettant de délivrer un taux constant en oxygène pouvant atteindre 10%, ou dans des cages permettant de réaliser de courts épisodes d'hypoxie en abaissant le taux d'oxygène à 5% sur 6-8 secondes une fois par heure sur la nuit, ce qui correspond au modèle utilisé pour mieux mimer le SAS. Les souris seront ensuite sacrifiées à différents temps pour analyses. Nous analyserons l'implication des différents acteurs cellulaires, leurs médiateurs chimiques en contexte hypoxique ainsi que l'effet de cette hypoxie sur la réponse aux anti-VEGF, et, une fois le mécanisme résolu, les animaux seront traités avec des inhibiteurs spécifiques issus des résultats de ces étapes pour développer de nouvelles thérapies.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour notre étude. Un total de 936 souris seront nécessaires. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs ou le personnel qualifié : enrichissement dans les cages, hébergement en groupe, utilisation d'anesthésiques nécessaires aux procédures, évitement de toute douleur ou situation stressante, accès boisson et nourriture 24/24, cycle jour/nuit 12h/12h. Il s'agira de limiter l'utilisation non justifiée d'animaux. Le nombre annoncé correspond au nombre nécessaire pour espérer faire ressortir des éléments significatifs en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

2686- Il existe un fort taux de pathologies cardiaques et respiratoires chez les malades anxiodépressifs. La prise de psychotropes augmente ce lien délétère et ces pathologies deviennent la première cause de décès chez ces patients. Il faut donc absolument développer de nouvelles cibles thérapeutiques contre ces atteintes. Notre projet s'inscrit dans ce cadre, et nous allons particulièrement cibler des régions du système nerveux central, comme étant potentiellement chroniquement activées en état anxieux et pouvant être responsables de ces altérations cardiorespiratoires. Pour cela nous utiliserons un modèle de stress chronique, chez le rat (n=72), basé sur l'anticipation de la défaite sociale. Ce modèle induit un état d'anxiété, et nous avons montré que des atteintes cardiorespiratoires étaient observées. Le blocage par l'administration dans le cerveau de certaines substances neuroactives permettront de mettre en évidence les régions impliquées dans ces modifications observées à distance du stress.

L'utilisation d'animaux est nécessaire car il faut un système cardiorespiratoire intégré et fonctionnel.

Dans chaque série, plusieurs procédures seront appliquées (enregistrement télémétriques cardiaques, prélèvements sanguins, analyse respiratoire, microinjections) pour réduire le nombre de séries d'animaux.

Le milieu est enrichi avec au choix :lanières de papier Kraft, maisons en carton, tunnel en carton ou carré de coton compacté.

L'observation de chaque animal sera effectuée 1 heure chaque demi-journée, pendant laquelle les animaux seront autorisés à interagir et seront manipulés par les expérimentateurs pour diminuer le stress de l'inconnu et de la contrainte (injection intra-péritnéale, etc...). Ils seront aussi habitués à la chambre de plethysmographie pour diminuer le stress d'un nouvel environnement

2687- Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Cette instabilité est responsable de l'accumulation au sein des cellules cancéreuses de mutations affectant leur patrimoine génétique et modifiant leurs propriétés biologiques. Nous étudions un type de cancer du côlon appelé MSI (pour « Microsatellite Instable ») car les mutations qui les caractérisent se concentrent sur certaines régions répétées du génome appelés microsatellites. Les cancers MSI représentent une catégorie de tumeurs de découverte récente.

Le système NMD (par Non SenseMediatedDecay), est un système de contrôle de transcrits aberrants qui induit la dégradation des ARN à codon stop prématuré. Nous avons identifié une mutation du gène HSP110 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante de la protéine chaperonne HSP110. L'ARN messagère d'HSP110 muté possède un codon stop prématuré qui donc le rend cible du système NMD. Nos résultats démontrent que HSP110 est fréquemment mutés dans les cancers MSI du colon, de l'estomac et de l'endomètre. Par des approches in vitro, nous avons démontré qu'une surexpression de la protéine mutante HSP110DE9 sensibilise les cellules tumorales aux agents anticancéreux comme le 5-Fluorouracil et l'oxaliplatine.

Notre objectif est de démontrer que in vivo l'inhibition du système NMD induit une augmentation de la protéine mutante HSP110DE9 et que cette inhibition (et donc l'augmentation du taux de la protéine mutée HSP110DE9) modifie la réponse des cellules aux agents anticancéreux (5-Fluorouracil et Oxaliplatine), prescrits en routine pour le traitement adjuvant des cancers du colon et de l'estomac, en faveur d'une diminution de la prolifération tumorale.

Le protocole pour cet objectif consiste à xénogreffer des cellules cancéreuses (lignées MSI) et le traiter avec un inhibiteur du système NMD, l'AMLEXANOX, qui est un médicament qui possède en France l'AMM (Autorisation de mise sur le marché) et qui est utilisé en traitement de l'asthme ou des aphtes chez l'homme aux USA et au Japon. A la suite de la prise de greffe les souris seront traitées ou pas avec un protocole de traitement au 5-FU et l'Oxaliplatine qui a déjà été validé dans notre laboratoire. Nous estimerons la progression tumorale à l'aide des mesures de la taille de la tumeur avec un pied à coulisse.

Nombre/Type d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 40 souris NMRI-NudeFoxn1(Nu/Nu) pour une durée maximale de 5ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

2688- La maladie d'Alzheimer est la plus courante des démences neurodégénératives. Elle est une priorité de santé publique, du fait du vieillissement de la population et de l'absence de traitements.

Les lésions du cerveau des patients comprennent l'accumulation de 2 protéines toxiques qui entraînent la mort des neurones. Il a été mis en évidence le rôle néfaste de la protéine JNK dans l'origine de l'apparition de la maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les conséquences d'une inhibition de JNK chez un modèle de souris reproduisant une la maladie d'Alzheimer. Le résultat attendu est l'identification d'un nouveau traitement pharmacologique de cette maladie.

Afin d'utiliser le moins d'animaux possibles, nous nous baserons sur de précédentes études ayant mis au point la dose supportée d'inhibiteur de JNK à injecter aux souris. Nous nous limiterons également à ne tester que 2 durées de traitement (3 mois ou 6 mois), afin de limiter les groupes d'animaux.

A raison de 8 animaux par groupe, ce qui est le minimum requis pour faire des analyses comportementales recevables scientifiquement, nous utiliserons au total 64 animaux.

Les souris transgéniques Alzheimer ne souffrent pas physiquement de la pathologie. L'injection de l'inhibiteur par voie intrapéritonéale, d'après les précédentes études dans d'autres modèles, ne leur provoquera pas de dommage. Nous injecterons les souris par voie veineuse, afin de valider ce protocole pour des tests prochains chez l'homme. Les critères d'interruptions sont définis avec précision (perte de poids, dyspnée, prostration...) afin d'éviter toute douleur chez l'animal. L'effet attendu, au contraire, étant une diminution de l'évolution de la maladie d'Alzheimer.

Ce projet sera réalisé au sein de deux laboratoires, une plateforme de comportement animal pour analyser leur mémoire et un laboratoire de recherche fondamentale afin d'analyser les échantillons biologiques.

2689- La diarrhée du veau dans les semaines qui suivent la naissance est une pathologie fréquente en élevage dont l'étiologie est multiple mais qui se caractérise toujours par une déshydratation pouvant conduire à la mort rapide de l'animal.

Les pertes liquidiennes provoquées par la diarrhée conduisent à un état de désordre électrolytique qui amplifie l'effet délétère de la déshydratation sur le comportement de l'animal (absence de réflexe de succion par exemple).

La réhydratation et le rétablissement de l'équilibre électrolytique est donc un facteur clé de réussite du traitement global de la diarrhée. Cette réhydratation fait appel en premier lieu à des réhydratants oraux dont l'efficacité sur l'hydratation mais aussi sur l'équilibre électrolytique doit être évaluée.

- Bénéfices attendus du projet : Ce projet a donc pour but de provoquer une diarrhée non infectieuse chez le veau de manière à provoquer une déshydratation de l'animal en dehors de tout contexte infectieux, permettant dans un deuxième temps d'évaluer l'efficacité de produits de réhydratation et/ou de produits antidiarrhéiques.

- Animaux : Ce modèle est développé chez le veau de la naissance jusqu'à deux à trois semaines d'âge, période qui couvre la majorité des diarrhées du veau selon leur étiologie. Le sexe n'a pas d'importance.

- Nombre d'animaux : Le nombre d'animaux nécessaire sera calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec une puissance adéquate (0.8 en général). Le nombre de groupes pourra varier selon les objectifs spécifiques de l'étude. En général, les analyses impliquent la comparaison entre un groupe témoin, placebo, et un groupe testé (soit 2 groupes) ; parfois, l'analyse peut comporter en plus un témoin positif (produit connu) et trois groupes testés (soit 5 groupes au total avec le groupe placebo). Pour l'établissement du modèle, un seul groupe peut être utilisé. Le nombre d'animaux par groupe pourra varier entre 4 à 12 selon l'amplitude des effets attendus. Le nombre d'étude par an est prévu à 2. L'enveloppe animaux s'élève donc à 600 au total pour 5 ans.

- Dommages attendus : En l'absence de traitement adéquat, la diarrhée provoque chez le jeune veau non ruminant une déshydratation rapide et des désordres électrolytiques conduisant rapidement à l'abattement de l'animal et à sa mort. La souffrance attendue est donc considérée comme sévère.

- Application des 3 Rs :

Remplacement : le but du projet est d'étudier l'efficacité des produits réhydratants dans un milieu physiologique régulé (homéostasie faisant entrer en jeu de nombreux mécanismes), il n'existe pas actuellement de méthode alternative susceptibles de remplacer l'expérimentation sur animaux vivants. D'autre part, les produits vétérinaires doivent avoir été évalués sur l'espèce cible.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum mais de manière à s'assurer que les buts des analyses soient atteints. Des méthodes d'analyses (paramètres cliniques et pathologiques cohérents sur lesquels les effets attendus sont maximum) et des méthodes statistiques (calcul du nombre de sujets nécessaires; conception en mesures répétées) permettent de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire sans toutefois compromettre les analyses.

Raffinement : Les conditions d'hébergement et de nutrition des animaux seront adaptées à leur besoins physiologiques en conformité avec la directive Européenne EC 2010/63. Pendant l'expérimentation, les animaux seront surveillés au moins deux fois par jour par le personnel en charge (animaliers, expérimentateurs et/ou vétérinaires). Des points limites seront définis permettant la sortie des animaux et, soit leur traitement, soit leur euthanasie

2690- Chez les ruminants, les principales réponses à des pratiques d'alimentation sont liées à l'action d'une population microbienne dense et variée au niveau du rumen. Ce microbiote est responsable de la fermentation des aliments dont les produits principaux sont les acides gras volatils (AGV), l'ammoniac, le gaz carbonique et le méthane. Ces produits influent la productivité de l'animal et ont aussi un impact environnemental avec les émissions de gaz à effet de serre (méthane). Le développement des stratégies alimentaires qui visent à optimiser la performance de l'animal et à réduire ses émissions de gaz à effet de serre nécessite de bien connaître les interactions entre le régime alimentaire, le microbiote et l'animal-hôte afin de prédire la partition des produits fermentés entre ceux valorisables par l'animal-hôte et ceux inutilisables, voire nuisibles à l'environnement (azote urinaire, méthane).

L'objectif de ce projet est de contribuer à une meilleure compréhension de ces interactions en couplant des approches expérimentales in vivo et in silico (modélisation mathématique) à partir d'une étude sur des chèvres laitières. Ce projet appartient au domaine de recherche appliquée. Les résultats obtenus pourront être extrapolés aux vaches laitières.

In vivo, la réponse de l'animal à différents régimes alimentaires sera mesurée aux niveaux zootechniques (ingestion, production laitière), physiologiques (métabolites sanguins), fermentaires (AGV, émissions de méthane) et du microbiote présent dans le rumen. A partir de ces données, des modèles mathématiques explicatifs et prédictifs de la composition des produits de fermentation dans le rumen seront construits. Ils concerneront notamment la libération du méthane et du gaz carbonique en intégrant les notions de dynamique de la fermentation et de variabilité individuelle des animaux. Etant donné que la construction de modèles mathématiques demande pour sa calibration des données expérimentales in vivo, l'expérimentation avec l'animal hôte est essentielle et irremplaçable.

Un des bénéfices attendus du projet est de développer des modèles mathématiques pour assister la conception de stratégies alimentaires optimales dans un contexte donné. De plus, dans une optique d'élevage de précision, le projet envisage de relier la caractérisation du microbiote du rumen à d'autres caractères phénotypiques de l'animal et de tester son intérêt en tant que biomarqueur de ses performances et de sa robustesse.

Le projet de 5 ans comprend deux phases : d'une part, une phase du test pour mettre en place un dispositif de mesure de méthane produit par l'animal et, d'autre part, son utilisation sur cinq régimes expérimentaux d'intérêt pratique pour l'élevage pour évaluer la fermentation ruminale (phase d'évaluation). Au total 104 chèvres (24 la première année, puis 20/an) provenant d'un élevage expérimental autorisé seront utilisées. Elles feront un court séjour dans des cases individuelles autorisant les contacts tactiles entre animaux lors des mesures d'ingestion et de digestibilité. En période de mesure de

production de méthane, elles seront en cases individuelles fermées mais auront des contacts avec leurs congénères lors de la traite.

L'état de santé et le bien-être des animaux seront évalués pendant toute l'expérience. L'ingestion et les postures des animaux seront utilisées comme indicateurs de santé.

2691- Les personnes âgées présentent une relative intolérance à l'exercice physique qui est liée à de nombreux facteurs tels que le fonctionnement cardiaque, la déficience de la capacité maximale respiratoire (VO₂max) et musculaire. Le VO₂max est un des facteurs déterminant de la morbidité et de la mortalité qui diminue avec l'âge (-10% tous les 10 ans). Il est bien connu que la masse musculaire est le tissu qui utilise le plus d'oxygène pour produire de l'énergie mais est également l'organe qui consomme le plus d'énergie. Avec l'âge, il a été montré une baisse de la masse musculaire, probablement associée à une diminution de sa qualité fonctionnelle (capacité à produire de la force, et de l'énergie).

Notre hypothèse est que l'absence ou l'altération fonctionnelle d'une enzyme métabolique, la créatine kinase (CK), pourrait être un des facteurs contribuant à une baisse du VO₂max avec l'âge. En effet, la créatine kinase est une enzyme clé qui participe à la production et au transfert d'énergie. Il a été démontré qu'avec le vieillissement, l'activité de cette enzyme diminue. Cela cause une baisse des performances physiques, ainsi qu'une atrophie musculaire. Afin de vérifier notre hypothèse nous allons utiliser des souris déficientes pour l'enzyme créatine kinase.

Pour expliquer la diminution du VO₂max et de la force musculaire chez les individus âgés nous évaluerons la capacité physique et l'adaptabilité à l'exercice des souris déficientes pour l'enzyme mitochondriale créatine kinase (CK) sur tapis roulant relié à appareil analyseur de gaz.

Ce type de protocole a déjà été mis en œuvre dans notre laboratoire sur des souris âgées de 24 mois qui ont significativement amélioré leurs capacités physiques sans donner aucun signe de souffrance et nous n'avons à déplorer aucune mortalité pendant la durée de nos expérimentations.

Cette procédure expérimentale est peu invasive, les souris sont une espèce animale s'adonnant spontanément à la course et dans la nature une souris sauvage court au maximum 30 km par jour.

Nos objectifs dans ce projet sont :

- 1- de déterminer la capacité maximale respiratoire (VO₂max) au niveau systémique (in vivo), au niveau musculaire et cardiaque (in vitro) de ces souris, ce qui n'a jamais été fait ;
- 2- de mesurer l'évolution de leur capacité physique (vitesse, distance parcourue) et de leurs caractéristiques fonctionnelles musculaires avec l'âge ;
- 3- d'évaluer et d'expliquer les adaptations de ces souris à un programme d'entraînement au niveau systémique (in vivo), musculaire et cardiaque (in vitro).

La majeure partie de ce projet impliquant des souris déficientes pour l'enzyme créatine kinase et une partie des souris témoins est déjà réalisée. Il nous reste à le compléter par l'évaluation de la performance à l'exercice et des paramètres physiologiques de 42 souris témoins. Ce nombre a été calculé au plus juste sur la base de nos travaux antérieurs, en utilisant un programme statistique adapté nous permettant d'établir le nombre optimal d'animaux dans les différents groupes (7 dans chaque groupe) pour générer des résultats expérimentaux exploitables. Il est donc impossible de remplacer la souris par un modèle cellulaire, ou de simulation informatique. Les souris seront hébergées en groupe de deux souris minimum par cage dans un milieu enrichi avec du matériel adapté à la construction de nids. Leur état de santé sera surveillé tout au long de l'expérimentation.

2692- Le développement et l'utilisation d'un modèle expérimental d'infection grippale chez le porc permet de répondre à deux objectifs:

1. Développer des vaccins et/ou des thérapies destinés aux éleveurs pour limiter les pertes économiques liées à la grippe porcine (retards de croissance, avortements, surinfections...)
2. Développer des vaccins et/ou des thérapies destinés à l'homme. En effet, le porc domestique est anatomiquement, génétiquement et physiologiquement proche de l'Homme, et représente un excellent modèle d'étude pour la grippe saisonnière humaine (souches virales infectieuses, tropisme et signes cliniques similaires)

Dans un premier temps, le projet vise à développer et caractériser un modèle d'infection grippale chez le porc (choix des souches virales, des doses, des voies d'inoculation, de l'âge des animaux, etc.)

Dans un deuxième temps, ce modèle servira à tester l'efficacité, l'innocuité et la pharmacocinétique de produits (pharmaceutiques ou non) à usage humain ou vétérinaire.

Dans le cas des produits pharmaceutiques vétérinaires, ces études sont nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché.

- Bénéfice attendu du projet : Les taux de mortalité suite à l'infection par la grippe porcine étant faibles, cette pathologie est relativement peu étudiée. Ce projet permettra de mettre au point un modèle expérimental de grippe porcine et de le caractériser (voie d'administration, inoculum, souches virales, modulation des paramètres zootechniques, signes cliniques, lésions à l'autopsie...). L'établissement d'un modèle expérimental contrôlé et reproductible est nécessaire au développement de nouvelles thérapies (préventives ou curatives) destinées à l'Homme ou à l'animal.

- Animaux : Le modèle sera développé chez le porc domestique (*Sus scrofa domesticus*) avec un statut sanitaire conventionnel (animaux provenant d'élevages classiques) ou EOPS (animaux provenant de fournisseurs agréés). Dans un premier temps, le modèle sera développé sur des porcelet conventionnels post-sevrage entre 5 et 8 semaines d'âge de façon à se rapprocher de

l'épidémiologie. Par la suite, l'âge des animaux dépendra du type d'étude (protocoles de vaccination directe ou de vaccination des truies avant mise-bas, traitements préventifs ou consécutifs à l'infection).

- 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 des études. Généralement, s'agissant d'études comparatives, 2 à 5 groupes seront constitués, le nombre d'animaux par groupe sera de l'ordre de 5 à 15, soit un effectif maximum de 75 animaux par étude. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 2, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 750 animaux maximum sur la période de 5 ans.

- Dommages attendus : La souffrance attendue est modérée et correspond à la pathologie induite par l'inoculation du virus de la grippe. Les signes cliniques attendus sont une hyperthermie transitoire (2 à 3 jours maximum), des difficultés respiratoires, de la toux, des écoulements nasaux, de l'anorexie et de la léthargie. En l'absence de traitement, le pic d'infection est attendu 24 à 48h après l'inoculation du virus, puis la pathologie se résout d'elle-même 5 à 7 jours après le début des symptômes. La mortalité attendue est nulle ou faible.

- Application des 3Rs :

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

. Réduction : Pour les études de développement de modèle, le nombre d'animaux par groupe sera réduit autant que possible (études de type "proof-of-concept"). Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat.

. Raffinement : Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements. La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux.

Pendant la phase animale (après inoculation) l'état de santé des animaux sera évalué bi-quotidiennement par le personnel en charge des animaux: animaliers et vétérinaires. En cas de dépassement des points limites (voir 3.4.13), les animaux seront traités (si les objectifs de l'étude le permettent) ou euthanasiés pour raison éthique.

2693- La découverte de nouvelles biomolécules, de même que le développement de nouveaux nanomatériaux, sont utiles pour des applications aussi variées que la mise au point de nouveaux médicaments ou de composants électroniques innovants, et nécessite une évaluation critique de leurs effets en santé humaine.

L'organisme humain, de même que celui des animaux, possède des barrières de protection naturelles très efficaces limitant les contaminations par la plupart des produits de l'activité humaine. Certains composés, de par leurs propriétés intrinsèques, peuvent cependant franchir ces barrières physiologiques et avoir un impact sur la santé humaine. Selon le mode d'exposition à ces produits, on peut être amené à étudier différents scénarios. Ainsi, en cas de contamination par voie aérienne, il est impératif de vérifier si des produits déposés dans les poumons pourront ou non franchir la barrière air/sang, ce qui entraînerait une contamination secondaire de tous les organes. Ce domaine concerne particulièrement les nanomatériaux qui, produits en très grande quantité et compte tenu de leur taille nanométrique, peuvent se retrouver en suspension dans l'air que nous respirons et donc s'accumuler dans nos poumons. D'autres barrières physiologiques sont en jeu dans le domaine du médicament, car le mode d'exposition repose très souvent soit sur une prise orale soit sur une injection intravasculaire. Dans le premier cas, le produit doit d'abord passer la barrière intestinale pour circuler dans le sang. Une fois dans la circulation sanguine, le médicament pourra potentiellement franchir différentes barrières, telles que la barrière hémato-encéphalique (protégeant le cerveau), la barrière materno-fœtale chez la femme enceinte ou bien les barrières épithéliales protégeant les organes.

L'évaluation du passage des barrières physiologiques par des biomolécules ou des nanomatériaux repose sur des études de biodistribution, combinant le marquage radioactif des composés étudiés à des études de radioimagerie de coupes d'organes. Aucun dispositif in vitro ou informatique ne peut reproduire un organisme entier, avec les différentes barrières à la diffusion des produits étudiés. Ces études impliquent donc l'exposition d'animaux vivants à des composés radiomarqués (3H ou 14C), par différentes voies (aérienne, orale ou intraveineuse). Des mesures de radioactivité dans tous les tissus/organes de l'animal permettront de quantifier la présence du produit utilisé.

Lors de cette approche expérimentale, trois projets distincts seront réalisés :

- Le projet Vecteurs Peptidiques concerne la capacité de certains vecteurs peptidiques à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE), après injection intravasculaire. Ces vecteurs peuvent faire passer la BHE à de nombreux médicaments (80% des médicaments ne traversent pas cette barrière seuls). La conjugaison du vecteur à un médicament ouvre ainsi la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour de nombreuses pathologies affectant le cerveau chez l'homme. Outre le passage de barrière, la biodistribution de ces vecteurs et de leurs médicaments conjugués devra être établie, afin de valider leur intérêt thérapeutique.

- Le projet Imines Cycliques concerne l'étude des imines cycliques produits par des dinoflagellés, des microorganismes marins s'accumulant dans la plupart des fruits de mer. Les molécules organiques de petites tailles, comme les imines cycliques, peuvent avoir un impact en santé humaine en raison de leur capacité potentielle à passer des barrières physiologiques, notamment celle de l'intestin.

- Le projet Nanomatériaux concerne la capacité à passer la barrière air/sang des nanotubes de carbone et du graphène, après une exposition pulmonaire de l'animal. Ces nanomatériaux aux propriétés exceptionnelles font l'objet d'un développement intense dans la plupart des pays industrialisés et sont ainsi produits en très grande quantité.

Les 3 projets, menés sur 5 ans, prévoient le recours à environ 1200 rongeurs nés et élevés à cette fin dans des établissements autorisés. Ce nombre a été réduit au minimum tout en gardant la puissance statistique nécessaire à l'obtention de résultats exploitables.

Bien que les méthodes expérimentales aient été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre, l'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe, selon les règles en vigueur dans l'animalerie, garantira leur bien-être. Leur état de santé sera surveillé tout au long du projet, ce qui permettra au vétérinaire de l'installation d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

2694- Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire et consistant en quatre procédures, a comme objectif d'évaluer les effets indésirables de produits sur des fonctions de reproduction et/ou sur le développement de la descendance ou d'animaux juvéniles, évaluation qui peut être requise par les autorités pour les demandes de mise sur le marché ou d'enregistrement de produits médicamenteux, chimiques...

Ce projet se résume en l'administration répétée (quotidienne en général) d'un produit pharmaceutique, chimique, vétérinaire... chez le rat pendant différentes phases du cycle de la vie: de la phase de pré-accouplement ou de la gestation au développement de la descendance (2e ou 3e génération), ou pendant le développement et la croissance d'animaux juvéniles jusqu'à leur âge adulte potentiellement. La voie d'administration est généralement soit celle prévue chez l'homme (produit pharmaceutique), soit orale (produit chimique).

Le rat est l'espèce recommandée par les autorités internationales et couramment utilisée dans les études de toxicologie. Le nombre d'animaux utilisés au maximum dans ce projet est estimé à 26000 (tenant compte d'une moyenne de 13 ratons nés par portée). Le nombre d'animaux traités par groupe/sexe (permettant d'obtenir des résultats robustes et d'atteindre les objectifs des études) et les doses initiales utilisées (choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive) suivent les recommandations des lignes directrices OCDE, FDA ou ICH.

L'hébergement des animaux est la plupart du temps individuel afin de protéger les gestations et portées, ou empêcher les agressivités entre males, et est recommandé pour certaines voies d'administration (expl: voie dermale pour éviter la contamination entre animaux et garantir la dose administrée sur la peau). Les dimensions des cages sont conformes à la Directive 2010/63 et une attention particulière est apportée à l'enrichissement environnemental.

Lors des études, l'état de santé des animaux est contrôlé régulièrement (observation des animaux et enregistrement des signes cliniques tous les jours, suivi poids corporel et consommation alimentaire au moins une fois par semaine) et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter tout inconfort ou souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais si la souffrance de l'animal est jugée trop importante et si aucun soin ne peut lui être apporté, il sera euthanasié selon une procédure éthiquement acceptable. Des examens non invasifs sont réalisés en cours d'étude. Des analyses hématobiochimiques et/ou urinaires peuvent être réalisées, ainsi que de la toxicocinétique, et une anesthésie est faite avant les prélèvements de sang selon la méthode utilisée. Des prélèvements d'organes pour analyse histopathologique ou des paramètres de sperme sont réalisés après euthanasie et/ou après anesthésie profonde juste avant euthanasie.

Les volumes d'administration des produits et les volumes de prélèvements sanguins sont en accord avec les recommandations EFPIA/ECVAM.

Il n'existe pas de méthode alternative in vitro pour ces types de procédure en raison de la complexité que représentent un organisme vivant et celle des processus de développement des concepti et des échanges dynamiques entre mère et descendance.

2695- Les pathologies infectieuses sont à l'origine de pertes économiques importantes dans les élevages cunicoles. Outre la mortalité engendrée (plus d'un quart des lapins meurent entre la naissance et la vente), les maladies entraînent des retards de croissance, une mauvaise conversion alimentaire (c'est-à-dire le ratio qui mesure la conversion de la quantité d'aliment consommé en poids vif corporel) et un défaut d'homogénéité des animaux à la vente. Parmi les pathologies fréquemment retrouvées en cuniculture, on retrouve: les coccidioses, la maladie hémorragique virale (VHD) et l'entéropathie épizootique du lapin (EEL).

. Les coccidioses sont dues à des coccidies du genre *Eimeria* qui parasitent le tube digestif entraînant un ralentissement, voire un arrêt de croissance pouvant aboutir à la mort de l'animal.

. La VHD est due à l'infection par un Calicivirus. L'infection se propage très rapidement par transmission directe ou indirecte et entraîne une mortalité élevée (40 à 90%).

. L'EEL est une pathologie digestive caractérisée par une perturbation de la flore digestive entraînant des dommages tissulaires et une réduction de l'absorption des nutriments. Plusieurs pathogènes ont été identifiés comme participant à l'EEL tels que *E. coli*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Pasteurella* et *Clostridia*.

De nouveaux produits sont constamment en développement par l'industrie pharmaceutique vétérinaire pour prévenir et/ou traiter ces pathologies. C'est pourquoi, des modèles infectieux réalisés en station expérimentale sont nécessaires afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de ces produits in vivo dans des conditions contrôlées.

- Objectifs du projet: Dans un premier temps, le projet vise à développer et caractériser des modèles expérimentaux de coccidioses, de VHD et d'EEL (choix des souches bactériennes, virales ou parasitaires, des doses, des voies d'inoculation, de l'âge/statut physiologique des animaux, etc.)

Dans un deuxième temps, ces modèles serviront à tester l'efficacité et l'innocuité de produits (vaccins ou thérapies) chez l'espèce cible dans un but de recherche ("proof-of-concept") ou réglementaire (études nécessaires au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché de tout médicament vétérinaire).

- Bénéfice attendu du projet: L'établissement de modèles expérimentaux contrôlés et reproductibles est nécessaire au développement de nouvelles thérapies (préventives ou curatives) qui seront utilisées plus tard dans les élevages.

- Animaux: Ces modèles seront développés chez le lapin domestique (*Oryctolagus cuniculus*) issus d'élevages agréés pour la fourniture d'animaux pour l'expérimentation animale.

L'âge et le sexe des animaux du projet dépend du modèle d'étude. Il s'agira le plus souvent de lapines reproductrices ou de lapereaux pré ou post-sevrage.

- 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 entre 6 à 30. Considérant que le nombre moyen d'études envisagées par an est de 2, nous tablons sur un nombre "enveloppe" de 1500 animaux maximum sur la période de 5 ans.

- Dommages attendus : Pour les 3 modèles (coccidiose, VHD et EEL), la souffrance attendue est sévère et correspond à la pathologie induite par l'inoculation du pathogène.

. Les signes cliniques de la coccidiose sont la diarrhée, l'amaigrissement, la sous consommation d'aliment et d'eau. En l'absence de traitement/vaccination, la mort se produit dans les 10 jours post-inoculation.

. Les manifestations cliniques de la VHD consistent en des signes nerveux et respiratoires, une apathie et une anorexie. La période d'incubation varie de 1 à 3 jours, et en l'absence de traitement/vaccination, la mort se produit habituellement en 12 à 36 h après le début de l'hyperthermie.

. Les signes cliniques de l'EEL sont des ballonnements importants pouvant ou non être accompagnés de diarrhée aqueuse de faible intensité ou d'une émission de mucus. En l'absence de traitement/vaccination, la mort de l'animal est attendue dans les 3 à 5 jours suivant l'inoculation. La mortalité attendue pour ce modèle est de 30%.

- Application des 3Rs :

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

. Réduction : Pour les études de développement de modèle, le nombre d'animaux par groupe sera réduit autant que possible (études de type "proof-of-concept"). 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. Pour les études règlementaires, le nombre d'animaux par groupe sera basé sur les lignes directrices (VICH).

. Raffinement : Les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées aux besoins physiologiques de ces derniers et leur permettront d'exprimer le plus possible leur gamme normale de comportements (cage avec nid pour les lapines avec portées). La contention des animaux visera à limiter au maximum le stress des animaux.

Pendant la phase animale (après inoculation) l'état de santé des animaux sera évalué bi-quotidiennement par le personnel en charge des animaux: animaliers et vétérinaires. En cas de dépassement des points limites (voir 3.4.13), les animaux seront traités (si les objectifs de l'étude le permettent) ou euthanasiés selon une des méthodes autorisées dans la directive.

2696- Le but de cette expérimentation est d'évaluer les effets de composés alimentaires sur les réponses immunitaires innées de cellules isolées de souris. Ce protocole sera utilisé dans le cadre d'activités de recherche (études pré-cliniques visant à établir des recommandations nutritionnelles pour la prévention de pathologies humaines) et d'enseignement particulièrement, au cours de travaux pratiques (TP). L'objectif de ces TP est d'initier les étudiants à la biologie cellulaire appliquée à l'immunologie en réalisant un isolement de cellules *in vivo* (sur animal sacrifié) pour étudier les réponses immunitaires induites par les cellules primaires après restimulation par différents ligands et composés alimentaires immunomodulateurs.

Le nombre d'animaux par séance de TP est limité à 6 (6 animaux x 5 séances) et à 3 par expérimentation s'il y a lieu (3 animaux x 5 expérimentations) soit 45 animaux par an. Les animaux seront des souris mâles C57BL/6J01aHsd âgés de 5 semaines lors de leur arrivée à l'animalerie et ils seront utilisés au plus tard dans les 2 semaines. Une injection intrapéritonéale de milieu thioglycollate sera réalisée 4 jours avant l'euthanasie pour augmenter le rendement de cellules collectées. Une souris par étudiant sera euthanasiée par le responsable du projet (6 étudiants donc 6 animaux par séance de TP ou 3 animaux/expérimentation dans le cadre d'activité de recherche) et les cellules immunitaires seront isolées à partir de différents organes (cavité péritonéale, organes lymphoïdes secondaires). Les suspensions cellulaires obtenues seront ensuite mises en commun afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour les expérimentations de restimulation des cellules *ex vivo* et pour pouvoir réaliser des statistiques adéquates. Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animaux par expérimentation est limité à 6, la procédure expérimentale (mise en commun des 6 suspensions cellulaires de cellules intrapéritonéales par séance de TP) est conçue pour être favorable sur le plan statistique afin d'obtenir un nombre satisfaisant de cellules. Il n'existe pas, à ce jour, de bon modèle *in vitro* (i.e. lignées cellulaires) pour étudier les réponses immunitaires sans avoir recours aux prélèvements chez les animaux. Les manipulations des animaux seront limitées à la répartition en cage collective, une pesée tous les 2 jours pour contrôler leur état de santé, une injection intrapéritonéale 4 jours avant l'euthanasie et aux changes afin de limiter au maximum les procédures stressantes. L'environnement des souris sera enrichi au moyen d'objets, tels que des nids et un tunnel en PVC sanitaire opaque adapté aux souris. Les conditions expérimentales ne sont pas susceptibles d'entraîner de douleur et la qualification des expérimentateurs permet d'éviter toute douleur lors des manipulations liées à l'entretien des animaux.

2697- Le projet vise à évaluer si le lapin pourrait être un bon modèle dans l'étude d'efficacité de nouvelles toxines botuliniques, en remplacement du singe. Ce projet permettrait, dans un premier temps, de valider ce modèle grâce à deux toxines de référence à une dose unique afin de pouvoir tester, dans un second temps, ces deux toxines + deux autres toxines candidates à différents dosages.

Ce projet utilisera 53 animaux, nombre minimal d'animaux pour pouvoir réaliser ce projet. Les animaux recevront une administration de toxine botulinique dans le muscle gastrocnémien (mollet) d'une des 2 pattes et une administration de véhicule dans le muscle de l'autre patte, puis ils seront régulièrement anesthésiés pour réaliser des mesures de force développée par le groupe musculaire dans lequel on aura injecté la toxine et le véhicule. A la fin de l'étude, les animaux seront euthanasiés et une autopsie sera réalisée.

Les animaux seront hébergés selon les standards en vigueur et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux

2698- Les troubles du développement sexuel (TDS) constituent un groupe important de maladies humaines avec plus d'un enfant sur 300 ayant des symptômes tels que les cryptorchidies et un sur 4000 présentant une inversion de sexe. Cependant les causes moléculaires de plus de 70% des TDS demeurent inconnues. Cela est dû au fait que notre connaissance des réseaux génétiques contrôlant la détermination du sexe est encore limitée. La détermination du sexe permet à un organe bipotentiel, la gonade, de se différencier soit en ovaire soit en testicule. L'identification de nouveaux gènes impliqués dans le développement des gonades est donc un objectif de la plus haute importance pour la compréhension des TDS.

Pour avancer dans notre compréhension des dysfonctionnements du développement sexuel, il est important:

-d'identifier les gènes clés contrôlant ce processus de développement et analyser si ces gènes présentent des anomalies chez les patients.

-de comprendre le rôle de ces gènes préalablement identifiés et comment leurs formes mutées induisent l'apparition de pathologies chez les patients. Une analyse détaillée de souris génétiquement modifiées récapitulant ces pathologies aidera à mieux comprendre l'étiologie des maladies, leur début et leur progression. Cela sera sans aucun doute un apport considérable pour aider les familles à décider si leur enfant atteint doit subir ou non une gonadectomie.

Les dysfonctionnements du gène *Nrg1* ont été décrits comme induisant des problèmes de fertilité quand ce gène est déficient dans la gonade après la naissance. Cependant, des résultats préliminaires montrent que cette voie de signalisation joue un rôle bien plus précoce dans la morphogenèse du testicule embryonnaire. Il nous reste à élucider comment les différents acteurs de cette voie de signalisation permettent la différenciation de tous les types cellulaires nécessaires à la mise en place du testicule. Cette voie de signalisation régule également l'apparition de certaines pathologies comme les cancers dans divers organes. Ainsi nous proposons d'utiliser des modèles qui permettent d'invalider le gène dans la gonade embryonnaire afin de ne pas affecter d'autres organes. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos expérimentations sur les échantillons prélevés. Dès que nous atteignons le nombre suffisant d'échantillons pour conclure nos résultats de façon significative, nous arrêterons nos expérimentations. Pour les animaux âgés risquant de développer des cancers, nous les surveillerons pour voir s'ils perdent ou gagnent du poids de façon anormale, s'ils restent prostrés, si la fourrure est normalement lustrée et pour tout défaut d'aptitude à l'autonomie. Si ces souris présentent des différences vis-à-vis de leurs sœurs, ces souris seront sacrifiées et analysées.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 115 souris. Ces résultats nous permettront d'avancer dans la compréhension des mécanismes contrôlant la différenciation des gonades et dans notre connaissance des facteurs responsables de TDS.

2699- Le tube digestif est un milieu complexe dans lequel coexistent différents types de cellules de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal est notamment composé de plusieurs milliards de microorganismes qui sont étonnamment bien tolérés par l'hôte. Dans certaines circonstances, la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal est rompue, conduisant à une réponse immune et à une inflammation intestinale ou extra-intestinale. C'est notamment le cas dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH). La rupture de cet équilibre s'illustre par une dysbiose au niveau du microbiote du tube digestif, c'est à dire une modification des quantités et des proportions des microorganismes. Nous avons récemment montré que le microbiote intestinal produit des molécules stimulant certaines cellules du système immunitaire via le récepteur AhR avec comme conséquence la production de certains médiateurs ayant des effets positifs en situation d'inflammation. Le but du projet est de comprendre le rôle d'AhR dans les interactions entre le système immunitaire intestinal et le microbiote en situation basale et au cours de l'inflammation. C'est un projet ambitieux qui s'étalera sur 5 ans et nécessitera 900 souris conventionnelles. Afin de précisément définir les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'inflammation et le rôle du microbiote dans ces maladies trois types de modèles de colites seront utilisés. En parallèle dans ces différents contextes le microbiote en lui-même pourra être modifié par différents moyens : traitements antibiotique, antifongique, gavage par des souches fongiques ou bactériennes ou même transfert du microbiote de souris conventionnelles dans des souris élevées stérilement depuis la naissance (axéniques). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post mortem à l'exception des fèces.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations in vitro sur des lignées cellulaires ou des cellules primaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Nos groupes de souris seront réduits à 8-10 animaux. Ce nombre d'animaux est calculé au plus juste en fonction de notre expérience antérieure pour garantir la qualité statistique des données. L'étude de ces écosystèmes impose le modèle

animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations in vitro. Il n'existe pas aujourd'hui de modèle in vitro récapitulant tous les paramètres du tube digestif.

Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulées,...). Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Le suivi attentif et régulier des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux. Les durées d'expérimentation n'excédant pas 42 jours et les conditions d'euthanasie sont clairement définies.

2700- Le remplacement articulaire prothétique permet actuellement de traiter de façon fiable les patients atteints de lésions dégénératives des articulations du membre inférieur (prothèse totale de hanche pour traiter l'arthrose). Plus de 1 million/an de prothèses sont ainsi implantées dans le monde, et avec le vieillissement de la population, ce nombre est en constante progression. Cependant, les études cliniques à long terme (15 ans de recul) ont montré que la durée de vie de tels implants prothétiques était limitée par la survenue d'ostéolyse (dégradation de l'os) autour de la prothèse de hanche ce qui entraîne la perte de fixation et donc une ré-intervention chirurgicale. Cette ostéolyse est le résultat d'une réaction inflammatoire liée aux particules d'usures libérées lors des frottements des composants de la prothèse articulaire (entre la cotyle et la tête fémorale). Les particules d'usure entraînent une réaction inflammatoire responsable de l'ostéolyse et donc de la perte de contact entre l'os et la prothèse de hanche. Il existe différents types de matériaux utilisés dans les prothèses, entre autre le polyéthylène. On distingue plusieurs types de polyéthylènes différents par leur procédé de fabrication et par leurs propriétés physico-chimiques : le polyéthylène conventionnel de haut poids moléculaire (UHMWPE = ultra-high-molecular-weight-polyethylene) réticulé ou non réticulé et le polyéthylène HALS (Hindered amine light stabilizers)

A ce jour il n'existe aucune étude comparative de l'effet « ostéolytique » des particules d'usure liées à ces 2 types de polyéthylène.

L'objectif a pour but d'étudier et de comparer le pouvoir ostéolytique des particules d'usures de ces deux types de polyéthylène afin de sélectionner lequel induit le moins une ostéolyse. Cette étude sera réalisée sur un modèle expérimental de souris.

Ce modèle de petit animal pour l'analyse de l'ostéolyse aux particules d'usure de polyéthylène est un modèle validé actuellement. Les souris utilisées seront âgées de 8 semaines. Des particules d'usure de polyéthylènes seront déposées sur l'os du crâne de ces souris (os facilement accessible, intervention la moins douloureuse).

Ainsi les particules d'usure de polyéthylènes au contact du tissu osseux de la souris permettront de mimer ce qu'il se passe au niveau des prothèses de hanche au niveau de l'os coxal chez l'homme. De la même façon cela va induire une réaction inflammatoire responsable de l'ostéolyse. Ce modèle permettra de déterminer l'innocuité des différents matériaux utilisés pour les prothèses de hanche et ainsi de choisir les matériaux les plus inertes.

Quatre groupes d'animaux (12 souris par groupe pour un total de 48 souris) seront constitués afin de réaliser une étude comparative entre les souris témoins (sans implantation) et les souris traitées avec différents polyéthylènes.

Deux techniques d'imageries non invasives (bioluminescence et microscanner) utilisant une anesthésie gazeuse légère seront utilisées pour suivre l'inflammation et l'ostéolyse sur un même animal.

Le suivi in vivo permet une étude longitudinale et ainsi de pouvoir utiliser 1 seul groupe de souris pour les différents temps d'analyse.

Une analgésie post opératoire sera mise en place pour palier à de probables douleurs. Un suivi quotidien de l'état physique et comportemental des animaux sera effectué. Dans le cas de douleurs persistantes et si les analgésiques sont sans effet notables ou en cas d'infection majeur non résorbable, l'animal sera retiré de l'étude et mis à mort.

Nous espérons ainsi que nos résultats contribueront à prolonger la survie des prothèses articulaires, et donc de diminuer le nombre d'échecs à long terme de ces implants.