



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 (36)

3601. L'objectif principal de ce projet est de déterminer le rôle du facteur BMP9 (Bone Morphogenetic Protein 9), ligand du récepteur ALK1 (Activin receptor-like kinase 1) dans le développement de la fibrose rénale. La fibrose interstitielle tubulaire est une pathologie souvent observée dans les maladies chroniques du rein. Mieux comprendre les acteurs responsables de ce processus est donc important pour apporter des solutions thérapeutiques. ALK1 est un récepteur de type 1 de la famille des récepteurs du TGF $\beta$  qui joue un rôle majeur dans l'angiogenèse, en particulier dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Cependant un groupe espagnol vient de publier un article qui montre que la fibrose rénale obtenue dans un modèle d'obstruction urétérale unilatérale (OUU) est augmentée chez les souris hétérozygotes *A/kt +/-* par rapport à des souris sauvages démontrant ainsi pour la première fois le rôle d'ALK1 dans la fibrose rénale. Notre laboratoire a identifié le ligand majeur du récepteur ALK1, le facteur BMP9. L'objectif de ce travail est donc de déterminer le rôle de BMP9 dans le développement de la fibrose rénale. Le projet portant sur le développement de la fibrose rénale, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Pour répondre à cette question nous avons obtenu, dans le cadre d'une collaboration avec un groupe américain, la souris invalidée pour le gène *Bmp9* et donc nous voulons voir l'effet de l'invalidation de *Bmp9* sur le développement de cette fibrose rénale dans le modèle d'OUU. Cette étude sera réalisée sur 12 souris (6 pour le groupe de souris sauvages et 6 pour le groupe de souris invalidées pour *Bmp9*). Chaque souris aura son propre contrôle interne (la ligation de l'uretère gauche entrainera une fibrose rénale gauche et l'uretère droite sera manipulée de façon identique mais ne sera pas ligaturée et servira de contrôle interne). Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour notre protocole expérimental (test ANOVA, nombre minimum d'animaux = 5 pour chaque groupe) et grâce à notre expérience dans le domaine (nos collaborateurs espagnols ont publié cette année une étude similaire dans la souris hétérozygote *A/kt+/-*), ce qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité de l'expérience menée. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Au moindre signe de souffrance, nous interviendrons immédiatement de manière appropriée et si nous ne pouvons pas réduire la douleur de l'animal ce dernier sera euthanasié. Ce projet a pour but d'identifier un nouveau facteur clé de la fibrose rénale. L'identification de ce nouveau facteur pourrait apporter de nouvelles possibilités thérapeutiques pour cette pathologie.

3602. -Le protocole consiste à étudier le rôle de différents microARNs dans le contrôle des maladies vasculaires prolifératives. Le modèle utilisé consiste à réaliser une angioplastie de la carotide gauche du rat à l'aide d'une sonde Fogarty 2F puis à injecter au niveau de la région lésée des virus codant pour des ARN antisens ou des microARNs dont le rôle a préalablement été démontré dans la prolifération *in vitro*. Pour déterminer les effets du traitement par plusieurs techniques indépendantes, 42 rats seront nécessaires. Deux semaines après lésion et injection des virus les animaux sont sacrifiés. Les carotides droites (contrôle) et gauche (injectée) sont prélevées et la prolifération est mesurée sur des coupes colorées à l'hématoxyline/éosine.

- Nous avons recours aux animaux car actuellement, il n'y a pas encore de méthode alternative *in vitro* ou *in silico*. Nous nous efforçons de réduire le nombre d'animaux et les 3 lots de 14 animaux restent le minimum qu'on peut utiliser dans ce protocole pour pouvoir tirer des conclusions scientifiques. 3 lots car 3 transgènes : un contrôle, un pour la sur-expression, un pour la sous-expression. Nous comptons environ entre 5 et 10% de décès.
- Raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins : On dépose dans la cage des animaux de la ouate pour un nid plus confortable.
- Si l'animal manifeste des signes de réveil après l'intervention, une faible dose d'anesthésique est rajoutée.
- Observation et surveillance continue des animaux. Une fois livrés les animaux vont être identifiés et auront une semaine d'acclimatation avant le début des expériences.

3603. Notre objectif est de démontrer que l'histotripsie (thérapie par ultrasons focalisée utilisant le phénomène de cavitation -effet mécanique-) est réalisable sur du tissu cardiaque *in vivo*. Nous devons travailler sur le vivant car le mouvement cardiaque est une des principales difficultés pour l'application de cette technologie. L'application de l'histotripsie *in vitro* (sur tissu statique) a déjà été réalisée à de multiples reprises (remplacement). L'enjeu serait de proposer une thérapeutique non invasive (par ultrasons) pour traiter des pathologies cardiaques normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme. L'expérimentation sur le gros animal, avec sternotomie (ouverture du sternum pour application directe sur le cœur), est une étape indispensable pour démontrer que l'application valvulaire est possible (notamment sur le rétrécissement aortique calcifié) et pour comprendre les limites actuelles de notre technologie (difficultés de suivi du mouvement ?, problème de puissance d'ultrason ?, temps de procédure sur une cible en mouvement ?). De plus, nous avons besoin de travailler *in vivo* sur une anatomie cardiaque similaire à l'anatomie humaine (en termes de structures et de dimensions). Le modèle ovin est donc nécessaire. Le nombre d'animaux a été précisément calculé, 12 moutons seront nécessaires pour ce projet (la technique sera testée sur valve native de 6 animaux et sur 6 autres après implantation d'une bioprothèse). Ce nombre permettra de répondre à l'objectif scientifique.

sans utilisation supplémentaire d'animaux. Enfin, étant donné que le sacrifice de l'animal se fera en fin de procédure durant l'anesthésie générale et si besoin les points-limites seront appliqués (Raffinement). Afin de réduire la souffrance de l'animal, toutes les procédures seront réalisées sous AG.

L'application de l'histotripsy sur des pathologies cardiaques, et sa validation, ouvrirait des nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces pathologies chez l'homme (cardiopathie valvulaire, cardiopathie malformative). Cela permettrait de proposer à long terme une solution thérapeutique non invasive et indolore (uniquement par ultrason), sans chirurgie ni cathétérisme.

3604. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS) est le trouble respiratoire nocturne le plus fréquent dans la population. Il se caractérise notamment par une hypoxie intermittente (HI), et il est aujourd'hui reconnu que la principale complication du SAOS est sa morbi-mortalité cardiovasculaire.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que le SAS était un facteur de risque de complications cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle, maladie coronarienne, insuffisance cardiaque ou encore accident vasculaire cérébral.

L'obésité et le SAS sont des pathologies étroitement associées, avec une prévalence de SAS chez des patients obèses supérieur à 30%, et une prévalence d'obésité chez des patients SAS d'au moins 60%

Il existe aujourd'hui un intérêt croissant dans les potentielles interactions entre SAS et obésité dans le développement des complications cardiométaboliques, notamment par l'intermédiaire des propriétés sécrétoires du tissu adipeux viscéral. Ce tissu a la capacité de sécréter de nombreux médiateurs de l'inflammation qui pourraient contribuer au lien étroit entre obésité et pathologies cardiovasculaires dépendantes de l'obésité. De récents travaux montrent que l'hypoxie pourrait moduler la sécrétion de ces facteurs pro-inflammatoires durant le sommeil chez le patient apnéique.

Ainsi, l'objectif de ce projet est d'étudier les effets conjoints de l'hypoxie et de l'obésité sur l'inflammation du tissu adipeux et l'atteinte vasculaire dans un modèle murin. Pour cette étude, nous utiliserons 50 souris C57bl6, mâles, âgées de 4 semaines au début du protocole. Les souris seront réparties en 4 groupes obèses et non obèses, soumises à l'HI ou non. Les procédures expérimentales utilisées pour ce projet n'apporteront aucune souffrance à l'animal.

3605. L'infection des plaies reste un défi et représente un fardeau considérable en termes de soins. Une reconnaissance précoce associée à une intervention diligente, appropriée et efficace n'a jamais été plus importante pour réduire les conséquences sur l'économie et la santé, tout particulièrement dans le contexte d'une résistance de plus en plus importante aux antibiotiques. Lorsque la prise en charge d'infections sur plaies cutanées est tardive, le traitement passe par l'administration par voie orale d'antibiotiques, le plus souvent à spectre large. Ce traitement entraîne une exposition de l'ensemble de l'organisme à la molécule active, pouvant induire, notamment avec les antibiotiques l'émergence de résistance.

Les pansements antimicrobiens, y compris les pansements à l'argent, sont utilisés dans la prévention ou la prise en charge des infections de nombreux types de plaies. Naguère, l'usage des pansements à l'argent était considérablement répandu. Toutefois, certaines études récentes ont conclu que les données disponibles sont insuffisantes pour démontrer que les pansements de ce type améliorent les taux de cicatrisation. Cette conclusion a suffi à créer des doutes sur son mécanisme d'action et son efficacité.

Le développement de nouveaux pansements par la fonctionnalisation chimique peut permettre de prévenir le développement de germes sur la plaie traitée, de traiter de manière locale une plaie infectée, de manière continue dans le temps grâce à un système chimique de libération contrôlée de principes actifs. Notre équipe a développé un nouveau pansement (dit «pansement fonctionnalisés») avec des textiles non tissés finis chitosane chargés par l'argent et de l'iodure pour l'application antibactérien sur la plaie. L'étude in vitro sur ce pansement fonctionnalisé a montré la délivrance prolongée de molécules actives ayant une activité antibactérienne.

Les résultats obtenus par les tests in vitro ne peuvent pas se remplacer à des données in vivo sur l'efficacité antimicrobienne, l'objet de cette expérimentation est de tester l'activité de différents pansements fonctionnalisés avec différentes molécules actives, chez la souris sur des plaies infectées par des germes bactériens couramment rencontrés dans ce type d'infection.

Cette étude consiste à créer une plaie cutanée en zone sous scapulaire chez la souris, de l'inoculer à l'aide d'un inoculum bactérien de concentration connue, et d'appliquer un pansement à l'aide des supports fonctionnalisés. Ces pansement seront renouveler au bout de trois jours, permettant une observation macroscopique de la plaie, ainsi qu'une étude microbiologiques des pansements à mis parcours.

En référence aux publications antérieures. Nombre d'animaux par groupe : n = 9 suffisant pour montrer avec une puissance statistique suffisante ( $\alpha=80\%$ ,  $p=0.05$ ) une différence entre les groupes par l'efficacité du patch. Après une étude in vitro préalable, permettant d'étudier l'adhésion bactérienne aux différents supports, la méthode de traitement chimique de matières a été optimisé, donc de réduire le nombre de groupe de test (4 groupes de pansement fonctionnalisés et 1 groupe témoin avec pansement non-modifié) pour l'étude in vivo, par la suite de réduire le nombre d'animaux utilisés à 90 totalement dans le projet in vivo.

Les études pilotes ont été réalisées pour démontrer les procédures expérimentales, avec laquelle les objectifs scientifiques sont atteints, peuvent être réalisées avant que les animaux souffrent.

3606. Obésité et DT2 majorent la morbidité et la mortalité en entraînant des désordres métaboliques dont la résistance à l'insuline des tissus périphériques (foie, muscles, tissu adipeux). La résistance à l'insuline associe des troubles sévères du métabolisme glucido-lipidique, une inflammation et un stress oxydant (SO) chroniques. Ses effets délétères sont quasiment ubiquitaires et se manifestent aussi au niveau cardiovasculaire en altérant la fonction endothéliale, l'endothélium étant la première cible de l'athéromatose. Obésité et DT2 sont en grande partie évitables car indiscutablement favorisés par l'inactivité physique et de mauvaises habitudes alimentaires. Ainsi, alimentation et activité physique interagissent sur notre santé : en termes de prévention, il est donc intéressant de considérer les interactions de ces 2 aspects de notre comportement et leur synergie éventuelle sur la santé. L'objectif de ce programme de recherche est de préciser, in vivo, les effets respectifs et combinés de l'entraînement et d'ingrédients alimentaires à effet biologique connu (antioxydant et/ou anti-inflammatoire) sur l'amélioration des complications cardiovasculaires survenant avec l'accumulation de facteurs de risques cardiovasculaires (DT2, obésité, sédentarité, âge,...).

Le projet soumis à cette demande d'autorisation porte essentiellement sur la prévention par l'activité physique du DT2 seul, sans obésité.

Dans un premier temps, l'effet d'un exercice modéré, chronique de 6 semaines sera étudié sur la fonctionnalité des vaisseaux de rats sains, souche Wistar, au total 2 groupes de 10 animaux seront constitués : groupe Sed et groupe Ex (voir protocole détaillé paragraphe 4). Les animaux âgés de 9 semaines entrent en protocole de course chronique, ou restent sédentaires. Ils terminent tous à 15 semaines d'âge. Tout au long de ce protocole, la glycémie et l'insulinémie sont suivies par des prélèvements réguliers de sang à la queue du rat. A l'issue du protocole, les animaux sont anesthésiés (cf protocole détaillé paragraphe 4) pour permettre le prélèvement sanguin intracardiaque (dosage

de glycémie, insulinémie, et mesure du statut antioxydant) ainsi que différents organes dont des anneaux d'artériels (mesure de la fonctionnalité de l'organe), le ventricule gauche, l'aorte abdominale, le muscle gastrocnémien sont congelés pour dosages enzymatiques (enzymes anti-oxydantes ou pro-oxydantes) et densitométrie (enzymes intervenant dans la fonction endothéliale).

Dans un second temps, l'effet d'un exercice chronique associé à un diabète de type 2, induit par une eau de boisson enrichie en fructose sera étudié. Le régime démarre à l'âge de 3 semaines et dure 6 ou 12 semaines. 4 groupes de 10 à 12 rats sont constitués : Sed FF, Sed 1/2FF, Ex FF et Ex 1/2FF (détail des groupes paragraphes 4 et synoptique paragraphe 3). Les rats entrent dans le protocole de nutrition à l'âge de 3 semaines et celui de course à l'âge de 9 semaines. Les mêmes dosages seront effectués à l'issue du protocole d'entraînement.

Le nombre total d'animaux utilisé dans ce protocole est de 66.

Nous travaillons dans le souci de la règle des 3 R :

Réduction : le nombre d'animaux est réduit au minimum statistique requis pour mener à bien ce projet.

Raffinement : tout au long du protocole, les conditions de stabulation et du protocole d'entraînement chronique sont réalisés dans un souci de bien-être de l'animal. La mesure de vitesse maximale aérobie (VMA) est une procédure considérée comme sévère : elle est réalisée dans le souci de bien-être de l'animal puisque d'une part l'animal est préalablement entraîné à réaliser un tel exercice (une semaine avant la mesure de VMA) et dès que cet exercice épuisant est réalisé, l'animal est immédiatement mis au repos, tout comme cela est effectué chez l'homme. Les prélèvements sanguins à la queue du rat servant à mesurer l'insulinémie et la glycémie des animaux relèvent d'une procédure modérée : une section de l'extrémité de la queue de 1mm est nécessaire mais est réalisée sous anesthésie locale.

Remplacement : L'utilisation du modèle rat est inévitable car nous travaillons sur les mécanismes intégratifs et donc sur l'organisme entier.

3607. Les porcs en croissance sont des animaux particulièrement sensibles au stress thermique, qui a des conséquences néfastes sur la santé des animaux, leur bien-être et leurs performances de production. En particulier, lors de vagues de chaleur, les porcs éprouvent des difficultés à réguler leur température corporelle, ce qui se traduit par une augmentation des fréquences respiratoire et cardiaque, et une élévation de la température corporelle. Pour limiter la quantité de chaleur à excréter et réguler leur température corporelle, les porcs réduisent leur niveau alimentaire afin de limiter leur ingéré énergétique. Par ailleurs, il a été montré que l'introduction de levures dans le régime des porcs permet de diminuer la température corporelle des animaux de quelques dixièmes de degré. En conséquence, l'introduction de levures dans le régime de porcs soumis à un stress thermique pourrait permettre d'augmenter la robustesse des animaux à un épisode de stress thermique, en augmentant la plage de variation de la température corporelle. L'objectif du projet est de tester l'effet de l'introduction de levures dans l'alimentation de porcs en croissance en fin d'engraissement sur leurs réponses physiologiques lorsqu'ils sont placés en situation de stress thermique. Le stress thermique sera induit par une élévation de la température ambiante de 24°C (température correspondant à la thermoneutralité) à 30°C. Les réponses physiologiques des porcs seront évaluées en plaçant ceux-ci dans une chambre respiratoire, de façon à mesurer leur comportement alimentaire, leur métabolisme énergétique (dépenses énergétiques), leur température cutanée et leur fréquence cardiaque pendant trois semaines consécutives, correspondant à une semaine de mesure des paramètres à la thermoneutralité et deux semaines de mesure des paramètres en situation de stress thermique (une semaine pour les réponses d'adaptation à court terme et une semaine pour les réponses d'adaptation à long terme à la situation de stress thermique). Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R : les réponses des porcs à un stress thermique sont spécifiques et les animaux utilisés dans le projet sont de l'espèce ciblée par les résultats de l'étude. Le nombre d'animaux utilisés dans le projet (24 animaux sélectionnés pour 12 animaux mesurés) a été réduit au maximum tout en assurant un nombre suffisant afin de mettre en évidence une différence statistique telle qu'elle a pu être observée lors de précédents essais. Nous avons également cherché à raffiner les conditions de l'expérience en utilisant des cages adaptées aux animaux expérimentaux et en mettant en place un stress thermique dans des conditions contrôlées (température et hygrométrie), avec un suivi en continu de la réponse des animaux.

3608. La Leishmaniose viscérale est une maladie parasitaire causée par le parasite *Leishmania donovani*. Cette maladie est mortelle chez l'homme en l'absence de traitement. Jusqu'alors considérée comme une maladie rare, la Leishmaniose viscérale est en expansion constante depuis une dizaine d'années de sorte qu'elle est aujourd'hui classée parmi les maladies émergentes, notamment dans les pays occidentaux et plus précisément dans le bassin méditerranéen. L'absence de vaccins efficaces et de molécules thérapeutiques sans effet secondaires néfastes représente un obstacle majeur pour soigner et éradiquer cette maladie. Notre objectif est d'étudier les interactions qui s'établissent entre le parasite infectieux et l'hôte mammifère au cours des différentes étapes du processus infectieux, de l'inoculation chez l'hôte à la colonisation de l'organe hépatique. Cette étude est primordiale pour comprendre ce qui se passe chez l'homme.

In fine nos objectifs sont i) d'élucider le rôle du système immunitaire hépatique dans les mécanismes de défense et de pathogenèse liée à la Leishmaniose viscérale et ii) de visualiser la réponse immunitaire hépatique en temps réel par microscopie. La qualité de ce projet est étroitement liée à la pertinence des modèles expérimentaux utilisés. -

Nous utiliserons la souris comme animal hôte de l'infection par *Leishmania donovani*. Ce modèle expérimental animal mime de manière assez fidèle la maladie humaine. L'utilisation de ce modèle s'avère donc indispensable pour remplir nos objectifs scientifiques. L'infection par *Leishmania* sera suivie chez la souris *ex vivo* et *in vivo* parce que de nombreux outils ont été développés chez cet animal permettant ainsi de répondre à des questions précises. Le nombre de souris total utilisé sera de 664 /an au maximum (voir & 3.4.10). Cette utilisation sera faite en prenant très strictement en compte la règle des 3R, remplacement, réduction et raffinement. Les dommages de ces expériences seront minimisés en prenant soin quotidiennement des animaux. Au moindre signe de détresse une réponse sera apportée.

Les résultats issus de ce projet permettront de mieux comprendre la maladie, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et donc de participer activement au contrôle de ces infections mortelles.

3609. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC), caractérisée par une inflammation, la démyélinisation et une dégénérescence axonale. Des études expérimentales ont montré que la perte de myéline, se traduit par la perte axonale et le handicap final. La thérapie cellulaire est une approche pour promouvoir la remyélinisation. Donc, trouver une source extensible, fiable et autologue de cellules à potentiel myélinique en vue d'améliorer la remyélinisation du SNC est nécessaire. Des cellules progénitrices neurales dérivées de cellules pluripotentes induites (iPSC-NPCs) ont été développées très récemment. Le potentiel de remyélinisation et la sécurité de ces cellules modifiées restent encore à être bien étudiés. Le potentiel thérapeutique de ces cellules sera étudié après transplantation des NPC dans la moelle épinière démyélinisée de la souris "shiverer" (MBP-/-) / Rag - / - (n=750) et la souris nude (n=325).

Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, aucune greffe ne sera réalisée sur les souris wild type. Si nécessaire, les souris hétérozygotes, qui présentent des phénotypes similaires aux souris wild type, serviront de contrôle. Dans la même volonté de diminuer au maximum le

nombre de portées pour réaliser les expériences, les 2 sexes seront utilisés indistinctement. Dans le but d'atténuer toute forme de souffrance, un antalgique (buprénorphine) sera administré en sous cutané durant les 4 jours suivant toute chirurgie réalisée sur des souris adultes.

3610. Ce projet est destiné aux étudiants universitaires de Master-1. Il vise à leur montrer, en travaux pratiques d'immunologie (TP), comment étudier et comparer les différents aspects de la mise en place in vivo de la réponse immunitaire suite à une ou plusieurs rencontres avec une protéine (antigène). Cette exploration est réalisée dans un modèle de souris injectées une ou plusieurs fois avec l'antigène KLH (hémocyanine de mollusque). L'évolution, tant quantitative que qualitative, de la réponse anticorps spécifiques de l'antigène sera particulièrement étudiée. Ces notions fondamentales en immunologie sont abordées de façon pratique par des moyens techniques classiques et très utilisés en laboratoire et donc d'importances dans la formation d'étudiants de M1 de notre parcours.

La mise en place d'une réponse immune est un processus complexe qui ne peut pas être récapitulé in vitro. Nous utilisons donc un modèle souris C57/BL6 qui est un animal très utilisé en laboratoire, peu coûteux, et qui permet l'utilisation de nombreux outils disponibles pour l'exploration immunologique du modèle. Le nombre de 54 souris par année universitaire est un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour l'étude cinétique de la mise en place de la réponse immune et pour que l'ensemble des étudiants manipulent en binôme (18 souris par groupe de TP et 3 groupes de TP de 18 étudiants). L'antigène KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin ou hémocyanine de patelle) choisi pour immuniser les souris est un antigène connu pour induire une bonne réponse immune. L'adjuvant poly-I:C, co-injecté avec l'antigène lors de l'immunisation des souris, n'induit pas d'inflammation excessive par rapport aux adjuvants classiques habituellement utilisés.

A la fin du protocole d'immunisation, certains groupes de souris subissent un prélèvement de sang à la joue (méthode conforme à l'expérimentation animale) afin d'obtenir les sérums immuns testés ultérieurement par les étudiants. Les souris sont ensuite sacrifiées par dislocation cervicale avant toute manipulation ultérieure réalisée par les étudiants. Les groupes de souris ne subissant pas de prélèvement sanguin sont euthanasiés à l'animalerie par inhalation de CO<sub>2</sub> juste avant le démarrage du TP.

Ce projet est en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Au niveau du remplacement nous avons une partie du TP ou nous utilisons de frottis sanguins fixées pour montrer les éléments du sang, une méthode que ne précise pas l'utilisation des animaux. Par contre l'étude de la production des anticorps nécessite des modèles animaux. Cependant l'évolution du protocole original a permis la réduction du nombre des animaux utilisées grâce à : i) Le partage d'animaux et de matériel biologique entre étudiants dans la même expérience ; ii) Une exploitation maximale de matériel biologique et des données (utilisation des cellules prélevées au début du TP pendant toute la durée du TP, obtention de sérums valables pour plusieurs années, partage des données entre étudiants). Au niveau du raffinement, une surveillance journalière des animaux sera assurée par les animaliers, personnel de l'animalerie qui a suivi une formation adaptée. Une modification importante introduite dans ce protocole par rapport au protocole utilisée avant dans notre centre a été le changement de l'adjuvant de Freund par l'adjuvant poly IC, un adjuvant qui induit une réponse immunitaire bonne sans induire une réponse inflammatoire local excessive (réduction de la douleur et la détresse chez l'animal).

Nous utiliserons 270 souris pendant les 5 années de durée du projet

3611. L'obésité est une pandémie qui touche 300 millions de personnes dans le monde et en France, 15% de la population adulte est obèse et un tiers est en surpoids. Les formes sévères d'obésité, souvent associées à d'autres pathologies telles que le diabète de type 2 et la stéatose hépatique, sont généralement réfractaires au régime, à l'exercice physique et à la pharmacothérapie. La chirurgie bariatrique est alors le traitement le plus efficace. Elle permet une perte de poids qui s'accompagne d'une amélioration des comorbidités et guérit le diabète dans 4 cas sur 5. Les deux montages chirurgicaux les plus pratiqués sont la gastrectomie longitudinale (sleeve) et le court-circuit gastro-intestinal de type Roux-en-Y (bypass). Ces chirurgies de l'obésité sont très efficaces mais très invasives, et s'accompagnent d'une mortalité et d'une morbidité non négligeable, d'où l'intérêt de rechercher des alternatives thérapeutiques. Pour ce faire, il est essentiel de comprendre comment la chirurgie améliore les paramètres métaboliques des obèses.

Sans être identique, l'adaptation de l'architecture et des fonctions intestinales suite à la chirurgie bariatrique rappelle ce qui est rapporté pour les patients ayant subi une résection étendue du grêle pratiquée pour des raisons accidentelles ou pathologiques. Cette résection étendue (plus de 80% de l'intestin grêle et souvent une partie du colon) est à l'origine d'une insuffisance intestinale et d'une pathologie appelée le syndrome de grêle court.

Nous émettons l'hypothèse que l'épithélium intestinal s'adapte après la chirurgie (modifications des cellules endocrines, des capacités absorbantes et de barrière). Ces différents types de restructuration gastro-intestinale modifient sa physiologie et induisent des changements du microbiote intestinal qui pourraient contribuer à la perte ou à la reprise de poids et à l'amélioration des paramètres métaboliques.

Les objectifs de ce projet sont de caractériser les mécanismes de l'adaptation gastro-intestinale en réponse à la chirurgie chez des modèles de rats (obèses ou non) et à terme chez des modèles de souris transgéniques afin de déterminer l'origine de l'amélioration des paramètres métaboliques en focalisant sur le rôle de la leptine, de l'insuline et des acides biliaires. Le but ultime est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques accessibles par voie orale pour palier à la chirurgie bariatrique chez les patients obèses ou au contraire stimuler la reprise de poids chez les patients souffrant du syndrome de grêle court.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 630 rats et 1104 souris. Les études de la physiologie gastro-intestinale, de son microbiote et des interactions entre l'intestin et le foie, le pancréas ou le cerveau, ne peuvent être réalisées que sur des animaux. Nos conditions d'élevage limitent au mieux les variations physiologiques et nos expériences pilotes ont permis d'accéder aux moyennes de variations attendues de certains paramètres (% de gain ou perte de poids, glycémie à jeun, etc.). Nous avons réalisé des analyses statistiques afin de déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaires par groupe pour observer une différence significative si elle existe avec un risque  $\alpha$  inférieur à 5% et un risque  $\beta$  inférieur à 10%. Un même groupe d'animaux sera analysé pour les mêmes paramètres en pré- et post-chirurgie puis post-mortem les tissus seront caractérisés en détails. Au moment du sacrifice de très nombreux organes seront prélevés pour être analysés dans le cadre de ce projet mais également pour des projets en collaboration, sur d'autres questions, avec d'autres équipes de recherche (anémie et obésité, fertilité et chirurgie bariatrique, stéatose hépatique et insuffisance hépatique...).

3612. PiT1 et PiT2 sont des transporteurs de phosphate (Pi) présents à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Dans les tissus minéralisés de l'organisme (os, le cartilage et dent), le Pi joue un rôle fondamental supplémentaire puisqu'avec le calcium il constitue la matrice minérale de ces tissus. L'étude du rôle physiologique de PiT1 et PiT2 dans les tissus minéralisés repose sur l'analyse du développement, de la croissance et la régénération du tissu squelettique et ne peut donc être réalisée que chez l'organisme entier. En effet ces mécanismes sont la résultante des actions de diverses hormones (hormone parathyroïdienne, FGF23, vitamine D) agissant sur plusieurs tissus (os, intestin, rein) et régulant des concentrations sériques de plusieurs ions (calcium, phosphate). Il n'existe donc pas de méthode

alternative à l'utilisation de l'animal pour ce projet. Nous avons récemment invalidé le gène PiT1 chez la souris et montré que cette délétion entraîne un phénotype léthal embryonnaire à E12.5, un stade trop précoce pour pouvoir étudier la minéralisation. Des observations d'autres équipes semblent montrer que la délétion de PiT2 entraîne une mortalité post-natale précoce, elle aussi handicapante pour l'étude du phénotype squelettique.

Ce projet consiste donc à établir des souches de souris dépourvues de gène PiT1 et/ou PiT2 fonctionnels spécifiquement dans les différents tissus squelettiques principaux, et d'analyser le phénotype de ces souris. Ces modèles animaux seront établis par croisement de souris génétiquement modifiées selon une stratégie Cre-lox. Les souris PiT1 ou PiT2 "floxées" seront ainsi croisées avec des souris dont le gène Cre est sous contrôle d'un promoteur spécifique du cartilage (promoteur aggrecan), des ostéoblastes (promoteur osterix), des odontoblastes et ostéocytes (promoteur DMP1). Des souris invalidées à la fois pour PiT1 et pour PiT2 dans ces tissus seront aussi établies.

Cette approche, et l'analyse phénotypique correspondante, nécessitent un grand nombre de souris. Les analyses phénotypiques seront réalisées sur un nombre d'animaux par groupe correspondant au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique. L'étude sera en effet réalisée pour les 2 gènes PiT (ensemble ou séparément), au cours du développement embryonnaire, au cours de la croissance, lors de la minéralisation chez l'adulte et dans un contexte arthrosique chez la souris âgée. Au total, 2211 souris seront nécessaires sur 5 ans pour mener à bien cette étude. Cette étude vise à comprendre l'implication de 2 protéines dans la physiopathologie du squelette. La formation du squelette et la régénération de ce tissu sont régulées très finement par l'organisme entier (hormone parathyroïdienne, concentration sérique d'ions, etc...). Il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour ce projet.

3613. Le cancer de la prostate représente la troisième cause de décès par cancer en France. Il est en constante progression en raison de l'allongement de l'espérance de vie et du dépistage massif à partir de 50 ans. A l'heure actuelle, les patients peuvent être traités par chirurgie, chimiothérapie ou encore radiothérapie. L'activité physique (AP) modérée et régulière fait désormais partie des moyens bien décrits pour réduire la sensation de fatigue et améliorer la qualité de vie des patients atteints de cancer dont le cancer de la prostate. Sa pratique est alors recommandée pendant et après le traitement, à raison de 30 minutes minimum par jour.

Toutefois, aucune étude ne s'est intéressée aux interactions potentielles entre l'exercice physique et la radiothérapie/chimiothérapie, ainsi que leurs mécanismes associés.

Notre projet a pour but de déterminer les effets d'une activité physique régulière sur (1) l'efficacité de la radiothérapie ou chimiothérapie et donc l'évolution tumorale, (2) la présence de métastases, (3) la toxicité de la radiothérapie ou chimiothérapie (cardiotoxicité, hépatotoxicité, neurotoxicité), (4) la fatigue musculaire. Pour ce faire, nous développons un modèle de souris nude porteuses de tumeurs prostatiques humaines soumises à l'association ou non de deux stratégies thérapeutiques : la radiothérapie/chimiothérapie et/ou un entraînement en course modéré. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de mimer de façon satisfaisante les effets de l'entraînement physique « in vitro ». Il n'existe donc pas d'alternative in vitro pour ce type d'évaluation.

Nous avons prévu 2 protocoles et 50 souris pour chacun des 2 protocoles (n=100 souris), afin d'obtenir un nombre de sujets suffisants pour juger du caractère significatif des résultats.

Protocole 1, 5 groupes: contrôle, cancer, cancer-entraînement, cancer-docetaxel, cancerdocetaxel- entraînement. Protocole 2, 5 groupes: contrôle, cancer, cancer-entraînement, cancer-radiothérapie, cancer-radiothérapie-entraînement. Ce protocole expérimental permettra de mettre en évidence les mécanismes cellulaires et moléculaires se produisant précocement dans la tumeur, son environnement et les tissus cibles en réponse à différentes stratégies. Les protocoles ne peuvent pas être réalisés en même temps car la réponse des tumeurs au docetaxel n'est pas identique à celle après radiothérapie. Il est donc impossible d'avoir un seul groupe « contrôle » pour les deux protocoles expérimentaux. Ces recherches visent également à établir des moyens de prévention et/ou de traitements et peuvent ouvrir des perspectives thérapeutiques.

3614. Notre étude s'inscrit dans un projet qui s'intéresse aux conséquences physiologiques à long-terme (au stade juvénile) d'une exposition larvaire à une hypoxie modérée. Ce type d'hypoxie est fréquemment rencontré dans le milieu naturel par les larves de poisson, et la compréhension des effets à long terme sur la physiologie des poissons est un enjeu important pour la prédiction des conséquences du changement climatique.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la condition physiologique de soles communes juvéniles (*Solea solea*) exposée transitoirement à une hypoxie en fin de phase larvaire, au travers l'analyse de 2 paramètres révélateurs de leur fitness :

- La croissance. Un suivi de croissance sera réalisé sur les individus afin de déterminer l'impact de leur histoire de vie sur leur développement somatique.

- La maturation sexuelle. Une analyse de la maturation et du sexe des individus, au travers de dosages hormonaux et d'analyses des tissus gonadiques, sera réalisée sur les individus afin de déterminer l'impact de leur histoire de vie sur leur développement sexuel et sur le sex-ratio de la population.

Le projet reposera sur le suivi de 235 soles juvéniles: 118 n'ayant jamais rencontré d'environnement hypoxique et 117 exposées expérimentalement pendant 8 jours à une hypoxie modérée en fin de développement larvaire. L'élevage larvaire dont sont issus les 235 juvéniles comprenait 12 000 larves.

Le nombre de larves mises en élevage a été déterminé au minimum (Réduire) en tenant compte des contraintes zootechniques telles que la densité minimale d'individus requise pour ne pas induire de perturbations physiologiques et permettre une croissance et un développement harmonieux, notamment au stade larvaire (Raffiner). De même, le nombre de poissons suivis et prélevés au stade juvénile a été déterminé au minimum tout en permettant une analyse statistique rigoureuse (prise en compte de la grande variabilité inter-individuelle). L'estimation a été faite à partir de données de variabilités obtenues dans des expériences préalables (calcul de la puissance statistique).

Des protocoles d'anesthésie seront pratiqués avant la manipulation des poissons que ce soit pour la mesure de croissance ou pour les prélèvements de sang (Raffiner). Le remplacement des animaux par un système de culture cellulaire ou in vitro n'est pas possible à notre stade de connaissance des effets à long terme d'une exposition à l'hypoxie pour évaluer les effets sur la physiologie du poisson.

3615. Un des problèmes dans la chimiothérapie anticancéreuse est la résistance des cellules tumorales à celle-ci. Il a été démontré que cette résistance est due, entre autre, à l'augmentation des molécules dites de survie telle qu'AAC-11 (Anti Apoptosis Clone 11) dans les cellules cancéreuses. Cette protéine joue également un rôle dans l'apparition des métastases. AAC-11 est surexprimée dans plusieurs tissus tumoraux comme les cancers de colon, de sein et de poumons. L'AAC-11 est augmenté dans les cancers de colon, de sein et de poumons. Nous avons démontré une implication critique d'AAC-11 dans la mort cellulaire induite par les agents anticancéreux. Une série de peptides

pénétrants capables d'inhiber la fonction biologique d'AAC-1 et de tuer ainsi les cellules tumorales a été développée. Les résultats préliminaires obtenus avec ces peptides pénétrants démontrent leurs propriétés anti-tumorales in vivo et suggèrent leur efficacité in vivo. Ces propriétés permettent d'envisager le développement de traitements innovants et performants basés sur l'utilisation des peptides que nous avons synthétisés. Il est donc nécessaire de poursuivre la caractérisation et l'évaluation en tant qu'agents thérapeutiques de ces peptides, en particulier à l'aide de modèles murins, afin d'évaluer les pathologies cancéreuses les plus à mêmes de bénéficier de l'utilisation de telles molécules.

Le projet consiste à évaluer ces peptides ciblant la protéine AAC-11 sur des modèles murins de xéno greffes, développés à partir de biopsies de patients ou de lignées cellulaires, reproduisant différentes pathologies cancéreuses. Les pathologies concernées sont, en hématologie : leucémies aiguës et chroniques, lymphomes, myélomes et syndromes myéloprolifératifs ; et pour les tumeurs solides : mélanome, cancer du sein, cancer du poumon. Il est à noter que ce projet fait l'objet de supports financiers de la part de l'Inserm-Transfert (« Proof of Concept of Projects with high Economical Potential ») et de la SATT (« sociétés d'accélération du transfert de technologies »).

La prise en compte de la règle des 3R fait partie intégrante de la conception des protocoles expérimentaux de ce projet. Les modèles que nous allons utiliser sont d'une utilité majeure en cancérologie, car ils permettent d'intégrer la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine. Un cancer se développant dans ces modèles présente l'ensemble des cibles rationnelles de la maladie cancéreuse, notamment son hétérogénéité cellulaire. On peut de plus considérer au travers de ces modèles la présence des barrières, qui existent également chez l'homme, limitant l'accès du produit à la tumeur, et également le fait que, lorsqu'on travaille sur un animal porteur de tumeur, cet animal a des tissus sains, de même que le patient ; ces tissus sains sont à protéger. En particulier, dans le cadre de notre étude, nous allons mesurer en même temps l'activité et la toxicité des traitements, ce qui permettra de gagner du temps ainsi que d'épargner d'autres animaux dans la validation des études de toxicologie qui devraient s'ensuivre. Un effort particulier a été réalisé pour réduire le nombre d'animaux utilisés dans ces études au minimum nécessaire et suffisant pour la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique. Nous avons aussi pris en compte un « surplus » d'animaux, nécessaire car lié aux pertes ou lié au fait que les réponses individuelles trop hétérogènes conduiront à écarter des animaux de l'analyse.

Le cas échéant, nous veillerons aussi à réduire au minimum (intensité et durée) les souffrances ressenties par les animaux. C'est pourquoi dans toute situation où il est possible que l'animal ressente de la douleur une analgésie préventive sera utilisée (lidocaïne à 7 mg/kg), de même qu'après tout geste chirurgical. En particulier, durant toute les procédures chirurgicales réalisées sous anesthésie un traitement support (tapis chauffant) et la surveillance des signes vitaux et des réflexes sera réalisée tout au long de l'acte. Ces procédures seront réalisées de manière aseptique.

Les cellules cancéreuses seront injectées chez la souris par voie intraveineuse, en sous-cutanée, en orthotopique ou intracardiaque. Les souris seront suivies et sacrifiées au plus tard au point limite défini pour les protocoles correspondants.

Ces projets nécessiteront l'utilisation de 400 souris/an, sur 5 ans.

3616. Le parasitisme gastro-intestinal est l'une des contraintes pathologiques majeures des petits ruminants au pâturage, sous toutes les latitudes. Chez les caprins Créole de Guadeloupe, il diminue la productivité laitière des chèvres, ralentit la croissance des chevreaux en allaitement et induit une mortalité et une morbidité importante pré et post sevrage. Le présent programme de recherche a été motivé par la nécessité de repenser la lutte contre ces parasitoses, jusqu'ici basée sur les traitements anthelminthiques. La résistance génétique aux nématodes gastro-intestinaux (NGI) a été très étudiée en ovin sous toutes les latitudes. En revanche peu de résultats sont disponibles en caprin. Or, la chèvre Créole est un modèle biologique original pour l'étude de ce caractère d'adaptation. La coévolution entre la chèvre et les strongles a été brève comparativement à l'ovin. Ses mécanismes de résistance vis-à-vis des strongles sont donc probablement plus primaires que chez le mouton chez qui ils ont eu le temps de se complexifier. Par ailleurs, la chèvre Créole du fait de son métissage et de la sélection naturelle à laquelle elle a été soumise, serait porteuse d'allèles favorables à son maintien dans un milieu à fortes contraintes. Le modèle caprin Créole apporterait ainsi des informations complémentaires qui aideraient à comprendre l'enchaînement des mécanismes en ovin, pour lequel aucun consensus clair n'est encore ressorti.

Le projet a été décliné en 2 objectifs :

1. Dans un premier volet, développer les outils pour introduire la résistance aux strongles gastro-intestinaux dans un schéma d'amélioration génétique des caprins Créole en Guadeloupe (procédure expérimentale N°1).

2. Dans un second volet, en s'appuyant sur le volet quantitatif précédent, développer les connaissances génériques autour du modèle caprin-NGI en identifiant les gènes de résistance et décortiquant les mécanismes de défenses des caprins en comparaison des ovins vis-à-vis de ces parasites (procédure expérimentale N°2).

Ce programme repose sur un troupeau expérimental de caprin Créole en production élevé au pâturage (250 mères suitées réparties en 12 familles) et 2 troupeaux expérimentaux divergents (résistants et sensibles aux NGI, 3x35 mères suitées) sélectionnés à partir du précédent et élevés en hors-sol. Jusqu'à présent, ce projet s'est appuyé sur l'analyse de phénotypes synthétiques (comme l'excrétion d'œufs de parasites dans les fèces, l'anémie, l'éosinophilie sanguine...) qui nous ont permis d'avancer dans la connaissance de nos caractères et de dégager des premières pistes de mécanismes. Ces phénotypes restent la base de nos études.

Pour aller vers une fine caractérisation des dynamiques des réponses de l'hôte en relation avec le statut génétique (résistant vs sensible) le second volet de ce projet va s'appuyer sur un nouveau modèle expérimental. Ce modèle va permettre de réduire le nombre d'animaux utilisé (pour une cinétique de 7 points 1 animal va en remplacer 7) et d'affiner les mesures effectuées (cinétique des réponses au niveau des sites de l'infection sur le même animal). Ce travail va permettre non seulement de caractériser des mécanismes sous-jacents à la résistance génétique, mais également d'identifier des bio-marqueurs qui permettront d'augmenter la puissance du schéma de sélection génétique.

3617. Les anomalies précoces du développement et de la maturation du cerveau sont la cause de pathologies cérébrales plus ou moins sévères. Elles peuvent avoir des conséquences pathologiques à long terme, telles que épilepsie, troubles du langage, autisme, etc. Ces anomalies peuvent avoir des causes diverses, notamment génétiques (mutations dans divers gènes importants pour le développement, la maturation et le fonctionnement du cerveau). L'étude de modèles animaux dans lesquels l'inactivation d'un gène donné, reproduit certains aspects cellulaires, moléculaires ou comportementaux, de la pathologie humaine d'intérêt, est classique et permet d'appréhender la physiopathologie associée à la maladie correspondante chez l'homme, et d'en proposer de nouvelles voies thérapeutiques potentielles ; elle permet aussi d'apprécier les grands mécanismes physiologiques de développement et de maturation du cerveau chez l'homme. Certains gènes ont été impliqués à divers titres dans les épilepsies avec troubles du langage.

L'évolution imprévisible et variable de ce spectre de pathologies, qui débute classiquement après une période de développement apparemment normal, est notamment liée aux déficits neuropsychologiques associés.

Notre projet vise à étudier des modèles convergents d'inactivation (knock-out) génétiques afin de comprendre ou de préciser certains des mécanismes et, in fine de proposer et tester des stratégies de détection précoce et d'intervention thérapeutique au cours du développement ou de la maturation du cerveau.

Pour chaque modèle, des analyses prénatales et postnatales à différents stades du développement et de la maturation cérébrales seront réalisées à différents niveaux (cellulaire, biochimique, histologique, électrophysiologique, comportemental, thérapeutique), en limitant au maximum le nombre d'animaux nécessaires (couplage des analyses lorsque cela est possible). Au total, le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de l'ensemble du projet pour les cinq années prévues sera de 3296 animaux. Le bien-être des animaux, qu'il s'agisse des souris gestantes comme de leur progéniture, sera évalué quotidiennement ; ainsi, croissance staturo-pondérale, aspect général, comportement seront notamment observés et pris en compte.

3618. Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs du système nerveux central les plus malignes et les plus fréquentes de l'adulte, cependant aucun traitement efficace n'est à ce jour disponible. Les inhibiteurs de l'apoptose (IAP) sont des inhibiteurs endogènes des caspases dont le rôle apparaît de plus en plus étendu. Afin d'étudier le rôle des IAP dans la régulation du caractère souche des cellules de GBM, la néoangiogenèse tumorale et le recrutement de cellules inflammatoires au site tumoral, des souris seront traitées ou pas au GDC-0152, un antagoniste des IAP, après implantation intracrânienne d'un sphéroïde de cellules de GBM. Un maximum de 135 souris sur une durée de 4 ans sera nécessaire pour mener à bien ce projet. La croissance tumorale, la vascularisation et le recrutement des cellules d'intérêt à la tumeur seront suivis au cours du temps par microscopie intravitale biphotonique. Une analgésie pré et post-opératoire sera effectuée afin d'éviter la douleur. La détection de toute souffrance de l'animal sera assurée et les animaux seront mis à mort dès l'apparition d'un signe de détresse (perte de plus de 20% du poids, ataxie). Les animaux ont une double utilité puisqu'en plus d'un suivi longitudinal par microscopie biphotonique, après euthanasie les cerveaux seront prélevés et préparés pour des analyses en cytométrie en flux. Ainsi le nombre d'animaux est divisé par deux. Le but du projet étant d'étudier le microenvironnement tumoral, aucune étude de remplacement ne pourra être mise en place afin de répondre aux questions scientifiques posées.

3619. Un des problèmes dans la chimiothérapie anticancéreuse est la résistance des cellules tumorales à celle-ci. Il a été démontré que cette résistance est due, entre autre, à l'augmentation des molécules dites de survie telle qu'AAC-11 dans les cellules cancéreuses. Cette protéine joue également un rôle dans l'apparition des métastases. AAC-11 est surexprimée dans plusieurs tissus tumoraux comme les cancers de colon, de sein et de poumons. Nous avons démontré une implication critique d'AAC-11 dans la mort cellulaire induite par les agents anticancéreux. Une série de peptides pénétrants capables d'inhiber la fonction biologique d'AAC-11 et de tuer ainsi les cellules tumorales a été développée. Les résultats préliminaires obtenus avec ces peptides démontrent leurs propriétés anti-tumorales in vitro et suggèrent leur efficacité in vivo. Ces propriétés permettent d'envisager le développement de traitements innovants et performants basés sur l'utilisation des peptides que nous avons synthétisés. Il est donc nécessaire de poursuivre la caractérisation et l'évaluation en tant qu'agents thérapeutiques de ces peptides, en particulier à l'aide de modèles murins, afin d'évaluer les pathologies cancéreuses les plus à même de bénéficier de l'utilisation de telles molécules.

Le projet que nous présentons vise à optimiser et évaluer l'efficacité antitumorale des peptides pénétrants ciblant AAC-11 que nous avons développés sur des modèles murins de xénogreffes.

Les expériences consistent à définir :

- la tolérance des peptides,

- le dosage des peptides au niveau du sang afin de définir sa fréquence d'administration,

- leur efficacité antitumorale sur 6 différents modèles précliniques de cancer : cancer de colon, de poumon, de sein, de l'ovaire, de la peau et de cerveau afin de définir les tumeurs pour lesquelles ce traitement est actif.

Le nombre de souris nécessaire pour l'ensemble de ces expériences est 2568.

Afin d'éviter le rejet des tumeurs d'origine humaine, les souris utilisées dans ces expériences sont des souris immunodéprimées. Les greffes des tumeurs se font sous anesthésie générale. Les injections de peptides se font par voie intrapéritonéale.

Le bien-être des animaux n'est pas modifié par la greffe ; les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie sont observés tout au long des expériences.

3620. L'épigénétique étudie les mécanismes chromosomiques induisant des changements héréditaires d'expression génique sans modification de la séquence d'ADN. Ces régulations épigénétiques peuvent être médiées par la méthylation de l'ADN ou des modifications post-traductionnelles des histones qui affectent la structure de la chromatine. La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique stable et réversible, qui se produit à la position 5 de la cytosine, principalement dans le contexte de dinucléotides CpG. Trois membres actifs de la famille des DNMTs ont été identifiés: la DNMT1 qui est l'enzyme responsable de la maintenance des patrons de méthylation au cours de la réplication de l'ADN, et les DNMT3A/B qui catalysent la méthylation de novo de l'ADN. La méthylation de l'ADN joue un rôle essentiel dans la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire, et elle est fortement perturbée dans les cancers. Le projet vise à étudier le rôle de la méthylation de l'ADN dans les décisions cellulaires au cours de l'embryogenèse chez la souris et d'identifier des facteurs qui recrutent la méthylation de l'ADN vers ces gènes cibles. Nos résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes et conséquences fonctionnelles des perturbations de méthylation en condition pathologiques.

Adéquation avec la règle des 3R :

Réduire: Nous avons scrupuleusement réfléchi à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Pour cela, nous utiliserons des méthodes de cartographie épigénétique que nous avons optimisées pour de très faibles quantités de cellules (<5000), ce qui permet de réduire drastiquement les quantités d'échantillons biologiques. Nous effectuerons également certaines expériences en duplicata plutôt qu'en triplicata pour réduire encore le nombre d'animaux. Enfin nous utiliserons des kits permettant de préparer des échantillons d'ADN et d'ARN à partir du même échantillon afin de réduire encore le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner: Les souris sont élevées selon les recommandations de la directive européenne 2010/63/UE dans des cages de grande taille et enrichies par un mouchoir. Nous n'effectuerons aucune expérimentation induisant stress ou douleur sur des animaux vivants. Toutes les lignées génétiquement modifiées déjà existantes n'induisent aucun phénotype douloureux. Au cours des élevages de ces lignées, nous sacrifierons les animaux âgés de plus de 2 ans ou dès l'apparition spontanée de signes de pathologies (perte de poids, tumeurs, blessures) ou de comportement anormaux (mobilité réduite, animaux prostrés, ne se toilettant plus, ne se nourrissant plus, vocalisations non sollicitées, pertes de comportements sociaux). Pour les lignées KO nouvellement créées, les animaux seront étroitement surveillés pour détecter précocement l'apparition éventuelle de phénotypes induisant potentiellement une douleur ou un stress. Ces animaux seront

surveillés quotidiennement et euthanasiés dès l'apparition de signes de pathologies (perte de poids, tumeurs) ou de douleur (mobilité réduite, animaux prostrés, ne se toilettant plus, ne se nourrissant plus, vocalisations non sollicitées, pertes de comportements sociaux). Remplacer: Les modèles de cultures cellulaires in vitro ne peuvent pas se substituer efficacement aux analyses in vivo car les cellules cultivées accumulent rapidement de nombreuses anomalies épigénétiques in vitro. C'est pourquoi nous effectuerons l'ensemble de nos expériences de biologie moléculaire sur des échantillons de tissus primaires.

3621. L'homéostasie tissulaire est maintenue par des réponses cellulaires innées à différents stress oncogéniques ou génotoxiques. Des défauts dans les voies contrôlant ces réponses peuvent causer le cancer. La sénescence cellulaire est un mécanisme essentiel de suppression tumorale et un programme de sécurité reconnu contre la progression du mélanome. Le mélanome est un cancer de la peau létalement fréquent, qui est lié à l'exposition aux ultraviolets (UV) solaires et/ou à des événements génétiques tels que la mutation oncogénique V600E de la kinase BRAF, ou la mutation de gènes suppresseurs de tumeur comme la phosphatase PTEN. La tyrosine kinase Syk (Spleen tyrosine kinase) est une kinase multifonctionnelle essentielle pour la signalisation des leucocytes en immunologie et hématologie. En cancérologie, la perte de son expression a été impliquée dans la suppression tumorale de certains carcinomes et des mélanomes cutanés. Nos travaux publiés ont montré que Syk exerce sa fonction suppressive dans le mélanome en induisant d'une part, une sénescence prématurée p53-dépendante et la kinase de stress JNK, et d'autre part, l'inhibition de la migration des cellules de mélanome. Cependant, les mécanismes exacts mis en jeu in vivo par Syk au cours du développement des mélanocytes et au cours de la suppression tumorale du mélanome sont totalement inconnus. Notre projet, qui a pour but de mieux comprendre les mécanismes cellulaires d'échappement tumoral au cours de la transformation maligne du mélanocyte en mélanome, pourrait avoir d'importantes retombées cliniques. En respect de la règle des 3R visant au mieux à réduire le nombre d'animaux, prendre en compte la douleur de l'animal et utiliser des méthodes alternatives (études in vitro et imagerie non-invasive par bioluminescence), le nombre total de souris estimé pour ce projet est de 528.

3622. *Staphylococcus aureus* est l'une des bactéries le plus souvent isolée à partir de prélèvements sanguins de malades. L'incidence annuelle des bactériémies à *S. aureus* (BSA) dans la population générale est évaluée à 28 pour 100 000 en Europe avec un taux de létalité variant de 22 à 26%. Également, la BSA est un facteur de mauvais pronostic au cours des pneumonies nosocomiales à *S. aureus* acquises sous ventilation mécanique. L'identification des facteurs de virulence de *S. aureus* favorisant la survenue d'une bactériémie à partir d'un foyer infectieux représente donc une question essentielle en maladies infectieuses. Pour cela, nous utiliserons un modèle murin d'infection (bactériémie et pneumonie) par différentes souches de *S. aureus* porteuses ou non de facteurs de virulence. Nous étudierons en particulier le facteur EDIN de *S. aureus* qui a été décrit comme capable de former des trous dans les cellules endothéliales. Nous chercherons ainsi à déterminer si ces ouvertures dans l'endothélium peuvent être responsable de la dissémination de la bactérie et l'apparition de foyers infectieux. Pour cela nous utiliserons un maximum de 360 souris. Cependant, dans un souci de réduction, et en fonction de la significativité statistique des résultats obtenus, ce nombre pourrait être réduit à 240.

3623. L'obésité définie par l'index de masse corporelle (IMC) supérieur à 30kg/m<sup>2</sup> atteint aujourd'hui 14% de la population française et 35,6% de la population aux USA. Cette pathologie est associée à de nombreuses comorbidités et à une morbidité accrue, liée principalement aux maladies cardiovasculaires et à certains cancers. Conformément aux recommandations pour les patients souffrant d'obésité sévère (IMC > 35kg/m<sup>2</sup>) avec une comorbidité susceptible de s'améliorer après chirurgie, ou d'une obésité massive (IMC > 40kg/m<sup>2</sup>) une prise en charge chirurgicale peut être proposée après échec du traitement médical (psychothérapie, nutrition, diététique pendant plus de six mois). La chirurgie bariatrique et métabolique permet une réduction pondérale significative et durable ainsi que des diminutions de la fréquence des sévérités de comorbidités dont le diabète de type 2 et de la mortalité cardiovasculaire. En 2011, la chirurgie métabolique ou bariatrique était le domaine de la chirurgie digestive le plus pratiqué dans le monde et en croissance continue compte tenu du nombre de chirurgiens et de procédures impliqués.

La gastrectomie longitudinale (sleeve gastrectomy) est une intervention qui consiste à réséquer les 2/3 ou les 3/4 de l'estomac par une section longitudinale à l'aide d'une agrafeuse mécanique pour créer un manchon gastrique et réséquer la zone du fundus qui produit la ghréline pour diminuer la sensation de faim. On a donc pour cette intervention, une action double qui est à la fois de restriction en créant un tube à haute pression (le manchon gastrique) et une action hormonale en supprimant la zone de sécrétion de la ghréline (film).

Le Progel® est un hydrogel, utilisé comme traitement adjuvant dans les fuites aériennes en cas de chirurgie pulmonaire. Le Progel® est efficace comme adjuvant pour la prévention des fuites aériennes dans un système à haute pression et à modification importante de pression qu'est le système respiratoire et en particulier le poumon lors de l'inspiration et de l'expiration.

Le but de ce projet est de démontrer l'intérêt du Progel® comme adjuvant dans la prévention de l'hémorragie et de la fistule post opératoire, après gastrectomie longitudinale.

Dans un premier temps, nous mettrons en place une étude sur 15 animaux (porc de taille réduite) comparant un groupe contrôle (n=5) et un groupe de renforcement mécanique standard et déjà utilisé (n=5) à un groupe Progel® (n=5).

Règle des 3 R : Remplacement : Les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes se produisant au sein de l'organisme entier (pressions exercées par le bol alimentaire, irrigation sanguine...) qu'il est impossible d'évaluer dans un modèle cellulaire ou autre.

Réduction : lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Raffinement : Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis pour éviter toute souffrance lors des interventions.

En fonction des résultats, une étude chez l'homme pourra être envisagée afin de démontrer l'innocuité et l'efficacité du Progel dans l'indication de la prévention de l'hémorragie et des fistules post opératoires en cas de gastrectomie longitudinale réalisée en cas d'obésité massive.

3624. L'arthrose est une maladie très fréquente qui touche les articulations, notamment les genoux, et qui est caractérisée par une dégradation progressive du cartilage articulaire, sans infection et avec peu d'inflammation locale. Dans une articulation affectée, la surface du cartilage se fissure, s'effrite et finit par disparaître. Cela s'accompagne du développement d'excroissances osseuses (les « becs de perroquet ou ostéophytes »). L'ensemble de ces lésions conduit à un enraidissement des jointures qui nuit aux mouvements. Aucun traitement médicamenteux efficace de l'arthrose n'est actuellement disponible car les mécanismes de survenue de cette maladie sont mal connus.

- L'os situé directement sous le cartilage (os sous-chondral) est impliqué dans les mécanismes qui conduisent à l'arthrose et on a observé que des vaisseaux sanguins s'y développaient en excès. Notre hypothèse est que ces vaisseaux jouent un rôle fondamental dans cette maladie. Cependant, on manque de données indiquant notamment quand et comment ces vaisseaux se développent.
- La présente étude a pour but d'effectuer une analyse de la cinétique du développement des vaisseaux situés dans l'os sous chondral, analyses qui ne peuvent être réalisées ni chez l'Homme, ni in vitro. Les rôles respectifs des contraintes mécaniques et de l'obésité dans le développement vasculaire seront analysés.
- Cette étude testera un modèle d'arthrose expérimental (induit par ménisectomie partielle) chez 136 souris qui seront comparées à 136 souris contrôles reparties en 17 groupes soit un total de 272 souris.
- Ces 17 groupes composés de 16 souris chacun permettront d'étudier la physiopathologie de l'arthrose dans différents modèles murins (traumatique, génétique, métabolique, surcharge). Les procédures sont réalisées sous anesthésie et un traitement antalgique sera administré pré et post-opératoire aux souris

3625. Ce projet a pour objectif de fournir des anticorps. Les anticorps sont des auxiliaires et des réactifs employés non seulement dans des procédés relatifs à la biochimie, la biologie moléculaire et l'immunohistochimie, mais aussi à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Lors de la production d'anticorps, on tire parti de la réaction naturelle de défense du corps contre des molécules étrangères.

Le protocole consiste à administrer un adjuvant, afin de préparer l'organisme de souris à l'inoculation des hybridomes et d'assurer un bon taux de production d'anticorps.

Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le Comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal. Ce projet pourra engendrer l'utilisation de 10000 souris sur 5 ans.

Le nombre d'animaux est calculé au plus juste de façon à répondre aux besoins de nos clients. De plus les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (Aspen brick, matériaux de nidification) dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires

3626. Ce projet a pour objectif de préparer des animaux (souris), afin de favoriser la fabrication d'anticorps au moment de l'injection d'hybridome. Les anticorps sont des auxiliaires et des réactifs employés non seulement dans des procédés relatifs à la biochimie, la biologie moléculaire et l'immunohistochimie, mais aussi à des fins diagnostiques et thérapeutiques. Lors de la production d'anticorps, on tire parti de la réaction naturelle de défense du corps contre des molécules étrangères.

Le protocole consiste à administrer un adjuvant, permettant l'augmentation de l'intensité de la réponse immunitaire.

Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera euthanasié selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le Comité d'éthique et la Structure Bien-être Animal.

Ce projet pourra engendrer l'utilisation de 610 animaux/demande client (soit 37000 souris sur 5 ans).

Le nombre d'animaux est calculé au plus juste de façon à répondre aux besoins de nos clients. De plus les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (Aspen brick) dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires

3627. Chez les vertébrés, le système nerveux contrôle toutes les informations sensorielles, les mouvements musculaires et le fonctionnement des autres organes. Cependant de nombreuses maladies du système nerveux n'ont pour le moment pas de traitement. Afin d'améliorer cette situation, une des voies d'avenir est une meilleure connaissance du développement du système nerveux central.

Au cours du développement, les cellules progénitrices du système nerveux doivent proliférer dans un premier temps, mais aussi migrer jusqu'à leur destination finale afin de former les différentes structures nerveuses. Depuis quelques années, il a été identifié que les molécules de guidage axonal étaient capables de guider la migration neuronale. Parmi ces molécules, les Sémaphorines et leurs récepteurs les Plexines sont d'excellents candidats. Cette grande famille de molécules découvertes dans les années 90 s'avèrent être impliquées dans de multiples processus cellulaires tels que le guidage axonal, le développement du système immunitaire, la tumorigenèse. Notre projet est d'analyser le rôle de la sémaphorine6A et de ses récepteurs les Plexines A2, B2 et A4 dans le développement du système nerveux central. Nous avons choisi de nous concentrer sur 2 structures : la rétine et le cervelet

Pour cela nous utiliserons uniquement des souris. Cette espèce présente l'avantage d'être très similaire à l'homme que ce soit anatomiquement, physiologiquement et génétiquement. En effet plus de 98% de son génome est identique à celui de l'homme. Afin de déterminer le rôle des sémaphorine6A et de ses récepteurs, nous analyserons 9 lignées de souris mutantes pour les gènes étudiés. Le système nerveux murin étant bien connu nous pourrions comparer le développement du système visuel et du cervelet de ces souris mutantes avec ceux de souris sauvages.

Parmi les lignées se trouvent des souris mutantes conditionnelles qui nous permettront d'analyser les conséquences de l'absence de ces gènes dans des cellules données.

Ce projet a été défini en suivant la règle des 3R. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 1827 pour 5 ans et les 4 procédures expérimentales. Ce nombre important s'explique par le fait que le développement de la rétine s'étale entre la mi-gestation jusqu'à 3 semaines après la naissance. Il est donc nécessaire de couvrir toutes ces étapes. Par ailleurs, il est nécessaire de pouvoir comparer tous les différents génotypes. Le cervelet se développant principalement post-natalement, seuls des nouveaux nés seront utilisés pour cette partie du projet. Ce nombre a été défini statistiquement en fonction d'études expérimentales précédentes.

Afin de réduire le nombre de souris utilisées, les yeux et le cerveau seront prélevés sur le même individu.

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

Deux des procédures expérimentales qui seront utilisées sont basées sur l'électroporation de plasmides dans les structures (rétine ou cervelet) afin de pouvoir exprimer des molécules fluorescentes dans les cellules en migration et de pouvoir les observer soit en microscopie en temps réel, soit d'étudier leur devenir plusieurs jours après leur introduction. Durant cette procédure les animaux sont anesthésiés et pour ceux qui sont maintenus en vie après électroporation, perçoivent un analgésique. Ils sont surveillés quotidiennement.

3628. Notre équipe de recherche étudie les mécanismes d'ossification pathologique, plus particulièrement dans le cadre des spondylarthrites. Il s'agit de pathologies articulaires inflammatoires et chroniques, caractérisées par l'ossification des enthèses, où les tendons et ligaments s'attachent à l'os.

En complément à nos analyses in vitro, nous souhaitons développer un modèle in vivo pour mieux comprendre les mécanismes d'ossification au niveau tissulaire, en prenant en compte la communication entre le tendon, le cartilage et l'os de l'enthèse. Il s'agit d'un modèle souris d'arthrite spontanée.

Le protocole expérimental a déjà été validé par d'autres équipes de recherche. A l'âge de 10 semaines, des souris DBA/1 mâles de différentes portées sont groupées dans une même cage. Elles développent alors spontanément une arthrite au niveau des membres postérieurs dans les 10 semaines qui suivent. (L'appellation DBA/1 correspond à une souche de souris de laboratoire non-transgénique.)

On s'assurera du bien-être des animaux tout au long de l'expérimentation. Le développement de la pathologie sera évalué par un score clinique chaque semaine. Il s'agit d'un processus spontané, avec une évolution lente. Au stade le plus avancé (après 10 semaines), les souris peuvent toujours se déplacer et s'alimenter correctement.

Cette planification expérimentale nous permettra de Réduire au minimum le nombre d'animaux nécessaires à notre étude (30 au total). Nous travaillerons avec des groupes de 6 souris, ce nombre étant requis pour faire l'analyse statistique qui nous permettra de valider nos résultats. De plus, il a été montré qu'avec ce protocole, 100% des souris sont atteintes après 10 semaines. Elles seront donc toutes utilisées pour nos analyses.

La méthodologie choisie correspond au concept de Raffiner l'expérimentation, dans le sens où nous avons préféré un modèle d'arthrite spontanée à des modèles d'arthrites induites qui nécessitent l'injection de substances ou des procédures chirurgicales. Par comparaison, notre protocole est moins invasif, moins délabrant et il conduit à une pathologie moins aiguë. En outre, la structure chargée du bien-être animal (SCBEA) assurera contrôle visuel journalier des animaux afin de détecter toute souffrance ou tout mal-être. Nous tenons également à rappeler que ce modèle in vivo n'est qu'un complément à nos analyses in vitro. L'essentiel de notre étude des mécanismes d'ossification pathologique étant réalisé sur des cultures cellulaires, nous essayons autant que possible de Remplacer les modèles animaux par des approches complémentaires.

3629. Le TRALI (Transfusion-Related Acute Lung Injury) est un œdème pulmonaire survenant quelques heures après une transfusion de produits sanguins. Bien que rare, il reste une des premières causes résiduelles de mortalité transfusionnelle. Le TRALI est provoqué le plus souvent par la présence d'allo-anticorps dans les produits transfusés, spécifiques de molécules d'histocompatibilité de classe I (MHC I chez la souris, HLA I chez l'homme) ou de classe II, ou de récepteurs présents sur les neutrophiles (antigènes des neutrophiles humains, HNA). Etant rare, les observations cliniques sont très difficiles à exploiter. Pour répondre aux nombreuses questions sur les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu lors du TRALI, et de proposer des stratégies thérapeutiques, il est nécessaire de développer des modèles expérimentaux. Les mécanismes cellulaires participant au développement du TRALI sont complexes, aussi les analyses fondées sur l'utilisation de méthodes expérimentales in vitro doivent être complétées par des études in vivo dans des modèles animaux et, réciproquement. A ce jour, deux modèles animaux de TRALI sont disponibles:

- un modèle murin induit par les anticorps humains anti-HNA3a ;
- deux modèles murins assez semblables induits par les anticorps anti-MHC I; le premier est fondé sur une pré-sensibilisation de souris avec des lipopolysaccharides, suivie de l'administration d'un anticorps anti-MHC I 24 h après, le second ne comporte pas l'étape de pré-sensibilisation. Ces deux modèles ont généré des résultats discordants, aussi des études complémentaires sont encore nécessaires. D'autre part, ces systèmes expérimentaux ne permettent pas de comprendre les effets des anticorps anti-HLA humains impliqués dans le TRALI.

Notre projet sera focalisé sur l'étude des mécanismes pathologiques du TRALI immunologique. Nous utiliserons les deux modèles expérimentaux de TRALI (anti-HNA3a et anti-MHC I) disponibles chez la souris. D'autre part, nous développerons un nouveau modèle de TRALI chez des souris transgéniques humanisées pour l'expression de molécules HLA I, récemment développées, pour étudier les propriétés pathologiques des anticorps humains anti-HLA I. Le projet aura également pour but d'approfondir les connaissances sur les médiateurs intervenant dans le TRALI, en particulier les nucléotides extracellulaires et leurs récepteurs P2.

Les nombres d'animaux utilisés seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives et le maximum de prélèvements sera réalisé sur les mêmes animaux. Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur:

- les souris seront anesthésiées (a) au début de l'expérience, si la souffrance (détresse respiratoire) est atteinte dans les 20 premières minutes après injection des anticorps, ou (b) dès que le point limite de souffrance est atteint ;
- le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort en vue de prélever les tissus ;
- les observations par microscopie intra-vitale seront réalisées sur des animaux anesthésiés qui seront ensuite mis à mort avant leur réveil.

Dans la mesure du possible, les expériences in vivo seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

Ce projet nécessitera 3130 souris.

3630. Les anticorps de lapin anti HBS sont utilisés pour la fabrication de test de diagnostic in vitro pour le réactif de confirmation du test de screening de la présence d'antigène du virus de l'hépatite B dans le plasma humain. Il permet de confirmer un résultat positif répétable obtenu avec le réactif VIDAS HBs Ag Ultra.

Le virus de l'hépatite B est responsable d'hépatites aiguës et chroniques. Les hépatites aiguës peuvent être asymptomatiques ou présenter des symptômes de gravité variable pouvant aller jusqu'à l'hépatite fulminante dans 0,1 à 0,5 % des cas. La chronicité survient dans 5 à 10 % des cas chez l'adulte mais jusqu'à 90 % des cas chez l'enfant lors de transmission périnatale. Actuellement, environ 350 millions de personnes dans le monde sont estimés porteurs chroniques du virus. L'hépatite B chronique peut être asymptomatique ou conduire à des lésions du foie de gravité plus ou moins importante pouvant entraîner une cirrhose puis une évolution possible, dans 5 % des cas, vers un hépatocarcinome.

Le virus de l'hépatite B peut être transmis par voie parentérale, périnatale, et sexuelle. Les personnes les plus exposées incluent le personnel de santé, les toxicomanes, les personnes à partenaires sexuels multiples, les polytransfusés ou hémodialysés, l'entourage familial d'un sujet contaminé et les nouveau-nés de mère infectée.

La détection de la présence de l'antigène HBS permet donc d'identifier une contamination par le virus de l'hépatite B et une prise en charge adéquate du sujet ainsi détecté.

Donc dans le cadre du diagnostic de l'infection par le virus de l'hépatite B, le test de recherche de l'antigène HBs dans le sérum des patients est systématiquement réalisé; En cas de résultat positif, un test de confirmation doit être réalisé pour vérifier que la positivité ne résulte pas d'une réaction interférente; pour ce faire, on refait le test mais en neutralisant au préalable l'antigène HBS avec un anticorps pour bloquer la réactivité immunologique ultérieure lors de la réalisation du dosage. L'obtention d'un test négatif après cette étape de neutralisation alors que le test est positif en l'absence de neutralisation confirme la présence de l'antigène HBs dans l'échantillon.

La neutralisation complète de la réactivité immunologique de l'antigène HBs ne peut-être obtenue qu'avec un anticorps polyclonal obtenu sur animal ; le choix du lapin comme espèce à immuniser répond au besoin qualitatif des anticorps et permet de limiter au minimum le nombre d'animaux nécessaire pour l'obtention des quantités d'anticorps requis.

L'expérience acquise sur ce type d'immunisation nous permet, pour une période de 5 années, de limiter à 260 lapins (13 lots de 20) le nombre d'animaux à engager dans le projet pour obtenir les volumes d'anticorps nécessaires pour assurer la production des tests de diagnostic qui seront fournis aux laboratoires d'analyses hospitaliers et privés réalisant les tests de diagnostic.

Les conditions d'hébergement des animaux sont définies pour favoriser la réduction du stress, en présence d'une ambiance musicale ; une surveillance de l'état général des animaux est réalisée et toute dégradation déclenche une demande de conseil auprès d'un vétérinaire.

En ce qui concerne le prélèvement des animaux, il est effectué sous anesthésie.

3631. Dans le cadre du programme de la formation pour le Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale : Niveau 1, des journées d'enseignements pratiques sur le lapin sont organisées. Ceux-ci ont pour le premier but de s'initier aux techniques d'anesthésie générale et d'analgésie préopératoire administrées par injection, et les techniques chirurgicales de base comme la trachéotomie et la pose de cathéters intraveineux et intra artériels périphériques (au niveau de l'artère et veine fémorale) en vue de prélèvements sanguins et d'injections ou de perfusions répétées de substances (ex : sérum physiologique, curare).

Le deuxième but de l'enseignement pratique est de savoir évaluer la fonction respiratoire et métabolique d'animaux anesthésiés par l'analyse des gaz du sang à partir d'un prélèvement d'un échantillon de sang artériel (0,4 ml/prélèvements) ainsi que d'étudier l'effet de la modification de la respiration sur l'équilibre acido-basique. Les prélèvements artériels sont analysés automatiquement en introduisant les échantillons dans l'analyseur des gaz du sang qui donne les valeurs de la pression partielle d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub>, d'acidité du sang (pH), de concentration en ions bicarbonate ([HCO<sub>3</sub>-]) et la saturation de l'hémoglobine en oxygène (SatO<sub>2</sub>).

Les lapins (1 à 2 lapins/groupes de 2 à 4 étudiants/jours, environ 12 lapins/an) reçoivent une prémédication par Xylazine (5 mg/kg en sous cutanée) 10 minutes avant l'anesthésie générale dont l'objectif principal est de réduire la peur, l'anxiété et la douleur préopératoire et peropératoire, faciliter l'induction de l'anesthésie et réduire la dose totale d'anesthésie générale. Après ils seront anesthésiés par administration intraveineuse de Pentobarbital (17mg/kg = 0,3 ml/kg).

Les lapins anesthésiés endormis seront placés sur le dos sur un tapis chauffant, afin de réguler leur température. Des électrodes seront fixées pour l'électrocardiogramme, ainsi qu'une sonde rectale pour contrôler leurs températures. Des injections en souscutanée de Lidocaïne (0.1 ml) sont réalisées au niveau des sites d'intervention pour permettre l'installation d'une sonde trachéale après trachéotomie et la pose des cathéters fémoraux. La sonde trachéale permettra le monitoring de la respiration et le branchement de l'animal sous respirateur lors de manœuvres de simulation d'hypoventilation et hyperventilation et leur effet sur l'équilibre acido-basique et gaz du sang. L'analgésie et la profondeur de l'anesthésie seront évaluées par le monitoring des paramètres physiologiques (fréquence respiratoire, fréquence cardiaque) et par la réaction aux réflexes (réflexes de pincement de l'oreille et de la patte, réflexe de déglutition, réflexe cornéen). L'analgésie préopératoire et l'anesthésie du lapin sera maintenue par bolus du 10ème de la dose initiale du produit anesthésique et ¼ de la dose initiale du Xylazine à l'apparition d'augmentation de la fréquence respiratoire et cardiaque et des mouvements des moustaches et de la tête lors d'un pincement de l'oreille ou flexion de la jambe et/ou mouvement du corps lors d'un pincement de la patte.

3632. Notre laboratoire est leader dans le développement de nouveaux médicaments anti-cancéreux afin de comprendre comment ils agissent et quelle efficacité ils ont sur les cancers colorectaux. Les patients atteints de cancers colorectaux sont généralement traités par chimiothérapie, utilisant l'Irinotécan comme principal agent anti-cancéreux. Malheureusement une certaine proportion de patients peut acquérir une résistance à ce médicament. Il est donc nécessaire de trouver une autre approche thérapeutique pour ces personnes.

Au laboratoire, nous avons choisi deux modèles cellulaires de cancers colorectaux provenant de patients atteints de cancer et nous avons développé à partir de ces deux lignées dites parentales, deux modèles de cellules devenues résistantes à l'Irinotécan mimant ainsi la résistance observée chez les patients en clinique.

Ces différents modèles cellulaires (sensibles ou résistants à l'Irinotécan) seront injectés à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, c'est souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Irinotecan ou son analogue le MM398) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ces médicaments.

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

A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront sacrifiés, les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos médicaments au niveau des voies de signalisation au sein des tumeurs prélevées.

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 144 souris réparties comme suit :

- 80 souris pour le protocole M1
- 64 souris pour le protocole M2

3633. Notre laboratoire est leader dans le développement de nouveaux médicaments anti-cancéreux afin de comprendre comment ils agissent et quelle efficacité ils ont sur les cancers colorectaux administrés seuls ou en combinaison.

Nous travaillons au laboratoire sur le développement pré-clinique de nouvelles molécules thérapeutiques destinées aux traitements de patients atteints de cancers colorectaux.

Dans la prolongation de nos résultats préliminaires où nous avons optimisé des combinaisons entre des inhibiteurs ciblant EGFR et d'autres inhibant le VEGF, nous souhaitons réaliser d'autres combinaisons avec des molécules ayant les mêmes cibles, en associant l'Erlotinib (un inhibiteur de la voie de signalisation EGFR) au Bevacizumab (anticorps dirigé contre le VEGFR).

Au cours de cette étude, 3 modèles de lignées de cancer colorectaux représentant la majorité des cas rencontrés en clinique seront utilisés au cours de ce protocole.

Ces lignées sont différentes entre elles par rapport aux statuts de certaines protéines connues pour être impliquées dans le développement de cancers lorsqu'elles sont mutées. Des études préliminaires en clinique ont montré que l'association de ces deux médicaments pouvait montrer une efficacité accrue sur la progression tumorale. Notre étude est là pour affiner cette efficacité de traitement en déterminant à quel statut correspondant la meilleure réponse. Le traitement pourrait alors être personnalisé dans le but d'augmenter les chances de guérison.

Nous avons choisi le modèle des souris nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, c'est souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Erlotinib seul, Bevacizumab seul et la combinaison des deux médicaments) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ces médicaments.

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

A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront sacrifiés, les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos médicaments au niveau des voies de signalisation au sein des tumeurs prélevées.

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 144 souris réparties comme suit :

- 48 souris pour R1 (SW-620)
- 48 souris pour R2 (HT-29)
- 48 souris pour R3 (SW-48)

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.

3634. Ce projet vise à montrer aux étudiants de l'Université, en travaux pratiques d'immunologie, la plasticité du système immunitaire. Cette plasticité va à se traduire en: 1) le développement des structures lymphoïdes "de novo" suite à un processus inflammatoire/fibrosant; 2) la modification des réponses des cellules immunitaires suite à cette inflammation/fibrose (polarisation de la réponse immunitaire).

La notion de plasticité immunitaire est une notion complexe et relativement nouvelle en immunologie qu'il est important d'aborder pour des étudiants en immunologie.

Nous prendrons comme modèle la souris dont une inflammation pulmonaire sera induite par l'administration intra-nasale de la bléomycine, un agent anti-cancéreux utilisée en chimiothérapie et qui a pour effet secondaire la fibrose pulmonaire. L'administration intra-nasale de bléomycine chez la souris entraîne une inflammation précoce qui en disparaissant, laisse la place à une fibrose pulmonaire caractérisé par la formation de structures lymphoïdes "de novo".

Nous nous intéresserons quantitativement et qualitativement aux recrutements des populations immunitaires (essentiellement macrophages) dans les lavages broncho-alvéolaires et les poumons per se. La notion de compartimentalisation du système immunitaire dans les différents organes en contact avec le milieu extérieur étant également une valeur montante. La fonctionnalité de ces macrophages en permet de capacité de phagocytose sera explorée par des techniques nouvelles, tels que l'imagstream.

Des techniques plus classiques d'immunohistochimie, dont l'utilisation est très utile en immunologie seront également mise en pratique. Enfin, l'exploration de la matrice extracellulaire dont l'importance est de plus en plus démontrée dans les migrations des populations immunitaires sera aussi réalisée par des techniques nouvelles de génération d'ondes harmoniques secondaires. Nous espérons ainsi aborder des notions en immunologie très actuelles par des techniques innovantes pour préparer les étudiants qui partent en stage le trimestre suivant à l'élaboration de projet porteur et novateur.

La mise en place d'une réponse immune est un processus complexe qui ne peut pas être récapitulé in vitro. Nous utilisons donc un modèle souris C57/BL6 qui est un animal très utilisé en laboratoire, peu coûteux, et qui permet l'utilisation de nombreux outils disponibles pour l'exploration immunologique du modèle. Le modèle C57Bl/6 bléomycine est déjà largement décrit. C'est un de seules modèles noninfectieuse capable d'induire la formation de tissus lymphoïdes tertiaires chez la souris.

Le nombre de 12 souris par année universitaire est un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour

l'étude de la mise en place de la réponse immunitaire et pour que l'ensemble des étudiants manipulent en binôme (12 étudiants par année) (60 animaux pour toute la durée du projet). Il aura aucune prélèvement pendant la réalisation du protocole expérimental et à la fin du protocole les souris seront ensuite sacrifiées par des méthodes réglementaires avant toute manipulation ultérieure réalisée par les étudiants.

3635. Les synéchies utérines sont des adhérences intra-utérines développées suite à un traumatisme endo- utérin tel qu'un geste chirurgical ou un accouchement. Les synéchies utérines sont des complications fréquentes après curetage ou hysteroscopie. Elles sont une des principales causes d'infertilité secondaire par trouble de l'implantation et de la nidation, par défaut du mécanisme de cicatrisation physiologique. Actuellement, il n'existe pas de moyen de prévention validé et recommandé dans les pratiques chirurgicales. Le but de notre étude est de développer un film anti-adhérentiel biodégradable qui éviterait la formation des synéchies.

Le prototype du film anti-adhérentiel a été élaboré au sein d'un laboratoire de chimie. Il s'agit d'un polymère résorbable et biodégradable, non toxique, bien toléré et dont l'efficacité in vitro a été démontrée. Les travaux expérimentaux sont menés par une équipe de chirurgiens gynécologues expérimentés ayant obtenu le niveau 1 concepteur en expérimentation animale.

L'hypothèse que nous souhaitons tester dans l'étude actuelle est que l'utilisation d'un dispositif mécanique aux propriétés anti-adhérentielle mise en place en intra utérin (utérus bicorne) améliore la reproduction d'une lapine ayant développé des adhésions intra-utérine après réalisation un curetage utérin.

Le modèle animal d'adhésion intra-utérine après curetage a été récemment mis en évidence sur un modèle lapin. L'objectif est donc d'obtenir un modèle simple, et reproductible pourvoyeur d'adhérences que nous utiliserons pour la suite de nos travaux scientifiques expérimentaux relatifs à la thématique de la prévention des adhérences utérines en étudiant la dégradation in vivo de notre polymère, dont on suppose que celle-ci est plus rapide qu'in vitro. Le but est d'observer une amélioration de la fertilité spontanée chez la lapine, après mise en place d'un dispositif anti-adhérentiel tubaire, en comparaison d'un groupe témoin. 60 lapines New-Zealand, réparties en 3 groupes de 20, permettront l'étude du dispositif en termes d'amélioration de la fertilité après curetage utérin et mise en place du dispositif. Chaque groupe aura pour but d'améliorer le dispositif en modulant les dimensions de celui-ci, ainsi que l'efficacité en faisant varier les doses de polymères anti-adhérentiel constituant le dispositif.

3636. 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 légale non corrigée chez les personnes âgées dans les pays industrialisés.

Cette maladie se caractérise, dans sa forme humide, par un remodelage vasculaire et l'apparition de néovaisseaux choroïdiens qui envahissent l'espace sous-rétinien provoquant une baisse brutale de l'acuité visuelle. D'autre part, le système immunitaire, joue un rôle important dans la modulation de l'angiogenèse mais également dans les neurodégénérescences associées à cette pathologie.

En clinique, les thérapies actuelles des DMLA, visent essentiellement le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Cependant, ils ne constituent pas une solution définitive du fait que 10% des patients sont résistants aux anti-VEGF et que ces traitements ne prennent pas en compte la part inflammatoire de ces pathologies. Les intégrines qui interviennent dans l'angiogenèse et l'activation des cellules inflammatoires pourraient offrir une approche pertinente aux stratégies déjà existantes. Dans le cadre de ce projet, nous nous proposons de tester des molécules anti-intégrines dont le potentiel anti-angiogénique a été validé successivement in vitro puis ex-vivo dans un modèle murin qui reproduit expérimentalement la DMLA telle qu'elle est observée chez l'homme.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour finaliser l'étude des propriétés anti-angiogéniques de ces molécules. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique de cette demande et a été déterminé en respectant le principe de remplacement, de réduction et de raffinement. Ce projet nécessitera un maximum de 759 souris. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental.

3637. L'objectif principal de l'étude proposée vise à caractériser l'impact de différents composés nutritionnels sur le développement d'une fonction clef du tube digestif, à savoir la fonction de barrière de la muqueuse intestinale.

L'étude proposée sera organisée en deux phases. La première phase sera une phase de screening de l'impact de plusieurs compléments alimentaires (administrée par voie orale pendant la période post natale (entre J7-J23-24) sur la perméabilité intestinale in vivo et ex vivo des rats. Cette étude sera complétée par la caractérisation de l'effet de ces compléments sur la réponse immunitaire des splénocytes et sur le comportement émotionnel et cognitif des animaux (anxiété, mémoire). De plus, ce projet comprend aussi le stockage de différents échantillons/tissus d'intérêt.

La deuxième phase du projet sera consacrée à l'étude des mécanismes d'action de l'un des compléments alimentaires sélectionné à l'issue de la phase 1. Ce complément sera choisi principalement au vu de ses effets sur la fonction de barrière. L'impact de ce complément sera étudié in vivo sur l'ensemble des principales fonctions digestives (motricité, perméabilité) du raton après 14 jours de régime. Dans une deuxième étape, l'impact de ce régime sur la plasticité du système nerveux entérique (neuro-gliale) sera évalué et les répercussions fonctionnelles de ces phénomènes de plasticité seront caractérisées ex vivo sur la perméabilité et la motricité. De plus, la capacité de ce complément à prévenir les modifications fonctionnelles digestives dans un modèle de séparation maternelle sera recherchée. Enfin, l'impact de ce complément alimentaire sur le comportement émotionnel et cognitif des animaux sera également étudié (anxiété, mémoire).

Le nombre total d'animaux utilisés sera de 312 rats sur la période de 3 ans du projet.

L'étude de mécanismes physiologiques liés à la digestion et la cognition nécessite l'utilisation d'un modèle complexe comme le raton. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des groupes réduits à des effectifs de 6 sont utilisés, le minimum permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Enfin, les animaux sont manipulés quotidiennement par le même expérimentateur pour limiter le stress induit par le gavage le cas échéant. Les mères n'intervenant pas directement dans cette étude, il convient de les valoriser en fin de protocole, par des prélèvements d'organes pouvant être utilisés pour des études in vitro.

3638. La surexpression dans les tumeurs pulmonaires de certains ligands a un effet anti-apoptotique en se fixant sur leurs récepteurs et favorisant ainsi le développement des tumeurs du poumon. Ce projet a pour but de tester les effets d'un médicament candidat antagoniste de l'interaction entre l'un de ces ligands et ses récepteurs. En empêchant l'interaction de ligand/récepteurs, nous espérons induire la mort des cellules tumorales et par conséquent de réduire ou inhiber la formation des adénocarcinomes et des métastases dans deux modèles murins de cancer spontané du poumon. L'objectif est d'évaluer l'effet propre de notre candidat médicament et son effet en synergie avec un traitement de référence. Pour cela, nous allons faire 6 groupes de 15 souris :

1 groupe témoin ne recevant aucun traitement

1 groupe recevant une dose de médicament candidat par semaine

1 groupe recevant deux doses de médicament candidat par semaine

1 groupe recevant de la carboplatine 1 fois par semaine

1 groupe recevant de la carboplatine + 1 dose de médicament candidat par semaine

1 groupe recevant de la carboplatine + 2 doses de médicament candidat par semaine

Ce protocole sera réalisé sur deux modèles distincts de cancer du poumon : un modèle de cancer à petites cellules (p53pRb) et un modèle de cancer non à petites cellules (non-small-cell lung cancer, K-ras). Ce qui représente donc au total 180 souris (2x90).

Néanmoins, ce protocole sera précédé d'une procédure expérimentale de mise au point sur 30 souris afin d'ajuster la dose de nos médicaments et de maîtriser parfaitement les gestes techniques. Ce qui porte à 210 le nombre de souris que nous utiliserons.

Afin de limiter le nombre d'animaux au strict nécessaire, nous agissons par étape. Une première partie positive déclenchant la mise en œuvre de l'étape suivante. Par ailleurs le nombre d'animaux par groupe a été déterminé de telle sorte qu'il soit suffisant pour mettre en évidence les effets recherchés. Par ailleurs afin d'assurer le bien-être des animaux, ils sont hébergés dans les conditions réglementaires et une grille d'évaluation permet d'évaluer l'état de bien-être des animaux et de procéder à l'arrêt anticipé de l'expérimentation si des seuils de stress ou de douleur sont proches d'être atteints.

3639. L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire chronique qui affecte principalement la membrane synoviale, les tissus cartilagineux et osseux et qui peut comprendre des aspects auto-immuns. Les traitements actuellement disponibles pour celle-ci laissent largement de la place pour de nouvelles entités chimiques ou biologiques visant de nouvelles cibles.

L'évaluation préclinique de candidat ayant au préalable montré des propriétés intéressantes dans des modèles *in vitro* passe aussi par une évaluation de leur potentiel thérapeutique dans des modèles *in vivo* chez le rongeur. La littérature reporte de nombreuses études conduites dans des modèles dans lesquels une pathologie de type auto-immune présentant de nombreuses caractéristiques de la pathologie humaine est induite chez le rat et/ou la souris. Un suivi clinique des animaux est réalisé permettant l'évaluation des effets prophylactique et/ou thérapeutique de candidat. Les effets de molécules innovantes seront comparés à ceux de molécules de référence (comme les corticoïdes par ex.).

Ce projet de 5 ans établi en conformité avec exigences de remplacement, de réduction et de raffinement prévoit l'utilisation d'un maximum de 1500 rats et de 1500 souris afin d'atteindre l'objectif.

3640. Le projet vise à comprendre le fonctionnement de la biosynthèse des centres fer-soufre un processus encore mal connu chez les mammifères. Pourtant, les centres fer-soufre sont des cofacteurs essentiels au fonctionnement des cellules et leur déficience est impliquée dans de nombreuses maladies chez l'Homme, la plus fréquente étant l'ataxie de Friedreich, une maladie très invalidante et encore incurable à ce jour. Mieux comprendre la biosynthèse des centres fer-soufre permettra ainsi une approche rationnelle dans le développement de thérapies. Dans ce projet, nous utilisons la souris car elle reproduit efficacement les maladies humaines associées à un déficit en centre fer-soufre et permet d'approcher la question dans un contexte physiologique, contrairement à une étude sur des cellules en culture rendant ainsi le remplacement par une technique *in vitro* impossible. Nous allons modifier l'expression de gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse afin de comprendre le rôle de chacun d'eux dans le processus. Le protocole utilise un virus AAV pouvant induire l'augmentation ou la diminution de l'expression du gène ciblé. Le virus utilisé sera injecté de façon locale dans le muscle *tibialis* antérieur des souris. Le phénotype obtenu dans le muscle sera ensuite analysé en profondeur grâce à des approches histologiques et de biologie moléculaire. Les expériences se feront dans un environnement contrôlé (pièce L2 - animalerie) et en respectant toutes les exigences relatives à la prévention de la douleur (injection et dissection sous anesthésie profonde). Afin de respecter la règle du raffinement, la douleur et l'inconfort générés après injection seront évalués en suivant une grille d'évaluation : en particulier, nous évaluerons l'état du muscle injecté (signe d'inflammation, de démangeaison), la douleur générale de la souris et la variation de poids pouvant entraîner l'utilisation d'analgésique ou nécessitant l'euthanasie. Afin d'obtenir une évaluation approfondie des mécanismes impliqués et une compréhension du rôle des gènes ciblés, une analyse statistique est nécessaire. Pour répondre à ces exigences, nous estimons à 250 le nombre de souris à utiliser. Le projet a cependant été conçu pour évaluer à chaque étape les besoins expérimentaux et ainsi minimiser le nombre de souris nécessaires.

3641. L'INRA entretient un troupeau d'animaux domestiques de l'espèce *Gallus gallus* dénommé « réserve de gènes ». Les animaux sont porteurs de mutations spontanées identifiées par leur effet sur des caractères directement observables et utilisées comme modèles d'étude pour ces caractères. Ce troupeau constitué à la fin des années cinquante est géré de façon à conserver le nombre maximum de mutations sur un nombre limité d'animaux, dont la reproduction est planifiée pour contrôler la consanguinité.

Cette ressource est le support de 3 grandes thématiques de recherche :

« variabilité génétique de la pigmentation et morphologie »,

« adaptation aux variations climatiques »,

« santé et robustesse ».

Les travaux portent sur :

-les effets des gènes sur les performances et l'adaptation au milieu de la poule,

-la cartographie génétique et identification moléculaire des mutations

- la production de génotypes « sur mesure » notamment pour le développement de nouvelles combinaisons génétiques (croisements, gènes à effets majeurs).

Le troupeau permet de maintenir des modèles génétiques utilisés pour des collaborations avec des chercheurs français ou avec des laboratoires étrangers (Suède, Angleterre notamment).

Le troupeau est structuré selon le type de fonction concernée :

- Coloration (plumes, peau, coquille)

- Structure/répartition du plumage

- Appendices (crête et barbillons)

- Squelette (nanisme, polydactylie)

- Métabolisme (polydipsie)

- Système nerveux (épilepsie)

Les effectifs mis en oeuvre sont de 1050 *Gallus* annuellement. L'intervalle de génération est de 12 mois. Cela représente 5250 animaux pour la durée du projet (5 ans).

Le processus de sélection (gestion pedigree en sous-groupes de génotypes hétérozygotes/homozygotes) implique de choisir les animaux futurs reproducteurs sur la base de leur phénotype ou de leur génotype lorsqu'il existe un marqueur moléculaire, de leur capacité reproductive (ponte, semence) et de leur apparentement, afin d'éviter les accouplements consanguins. L'effectif et la taille des familles doivent être suffisants pour limiter l'augmentation de la consanguinité. Ils sont déterminés en fonction des qualités reproductives des générations précédentes. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs. L'objectif de ce document est de valider :

-la procédure d'élevage des animaux,

-la procédure expérimentale de prise de sang appliquée à tous les animaux de chaque génération pour l'entretien de ces modèles,

-la procédure expérimentale de prélèvement de follicules plumeux, appliquée à un sous-ensemble d'animaux (10% de l'effectif total).

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Le maintien sur pied des animaux est nécessaire pour mettre en oeuvre les programmes de recherche. - Réduire: Le nombre d'animaux nécessaire à l'entretien et au renouvellement des animaux est basé sur la limitation de la consanguinité et des qualités reproductives des troupeaux.

- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et les prises de sang et les prélèvements de plumes sont limités au strict minimum (1 fois) pour limiter leur stress.

3642. L'INRA entretient un troupeau de cailles japonaises « réserve de gènes » depuis une trentaine d'années, les animaux sont porteurs de mutations spontanées à effets visibles. Le troupeau est utilisé pour décrire et comprendre la variation génétique (gènes de coloration, caractères quantitatifs, marqueurs moléculaires) et dans certains cas comme valorisation de la caille comme modèle expérimental en recherche biomédicale (diabète insipide). Le troupeau permet de proposer des modèles génétiques pour des collaborations scientifiques avec des partenaires français et étrangers.

Le troupeau est structuré selon le type de fonction touchée :

- Coloration du plumage : Rusty ; Lavender Silver Recessive black Yellow Fawn Cinnamon
- Structure du plumage : « Curly »
- Métabolisme: « diabetes insipidus » (lignée sélectionnée présentant un diabète insipide)
- Coloration de la coquille : White egg, Celadon egg

Ce projet présente les différentes opérations réalisées pour renouveler et entretenir les lignées de cailles porteuses de mutations à effet visibles. Le processus de sélection (gestion par pool sans pedigree) implique un choix d'animaux futurs reproducteurs dont l'effectif est nécessaire pour limiter une augmentation importante de la consanguinité parmi des candidats. Le nombre d'animaux jeunes mis en place est donc supérieur à celui des futurs reproducteurs. L'objectif de ce document est de valider l'élevage des animaux et la procédure expérimentale de prises de sang des animaux pour l'entretien de ces modèles dont certains sont uniques.

Les effectifs utilisés sont de 1540 animaux annuellement (2 X 770) car l'intervalle de génération est de 6 mois. Cela représente 7700 animaux sur la durée du projet (5 ans). 70 cailleaux de chaque lignée sont mis en élevage (11 lignées) par génération. Les animaux sont entretenus en « pool » de mutation sans pedigree, les effectifs retenus à chaque étape sont définis pour permettre le maintien des animaux sur pied (la congélation des semences chez la caille n'est pas techniquement possible) en tenant compte des effets délétères de la consanguinité.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Le maintien sur pied des animaux est nécessaire pour mettre en oeuvre les programmes de recherche.
- Réduire: Le nombre d'animaux nécessaire à l'entretien et au renouvellement des animaux est basé sur la limitation de la consanguinité et des qualités reproductives des troupeaux.
- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des cailles d'élevage et les prises de sang sont limitées au strict minimum (1 fois) pour limiter leur stress.

3643. En chirurgie digestive, un certain nombre d'interventions réalisées en pratique courante en chirurgie oncologique nécessite des anastomoses colo-rectales. Ces anastomoses digestives sont réalisées selon différentes techniques : sutures manuelles ou sutures mécaniques.

Actuellement, il existe un taux de fistule résiduelle responsable d'une morbidité importante, avec une augmentation de la durée moyenne de séjour, ainsi que d'une mortalité non négligeable.

L'objectif global de notre recherche actuelle concerne la mise au point d'une pince d'anastomose digestive colo-rectale mécanique à fils permettant de réduire les complications post-opératoires dans ce genre de chirurgie.

L'objectif de ce projet scientifique préliminaire est de déterminer les modalités techniques (nombre de sutures, type de fils) nécessaires pour la conception de ce dispositif particulier en évaluant les réactions histologiques et les caractéristiques mécaniques de sutures expérimentales. L'impact de ces dispositifs sur le système digestif nécessite une phase obligatoire d'évaluation *in vivo* (remplacer) qui ne peut pas être reproduit *in vitro*.

A l'heure actuelle, la littérature ne permet pas d'obtenir de renseignements suffisamment précis concernant les fils à utiliser et le nombre de points nécessaires pour obtenir une résistance idéale et une cicatrisation locale satisfaisante au niveau de l'anastomose.

Ce projet utilisera des modèles animaux de porcs adultes (poids = 50-60kg, n=16) dont la circonférence colique ainsi que les caractéristiques pariétales du colon sont comparable à l'homme, avec un comportement similaire des anastomoses réalisées.

Notre expérience du modèle nous permet de réduire le nombre d'animaux utilisés (mortalité/chirurgie < 25%). Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent (raffiner).

3644. L'hypertension artérielle est caractérisée par le développement progressif d'une inflammation vasculaire et une diminution du monoxyde d'azote (NO) produit par l'endothélium (1<sup>o</sup> couche de la paroi des vaisseaux), menant à une aggravation de la vasoconstriction. Pour suppléer à ce déficit, des molécules donneurs de NO peuvent être utilisées et nous nous intéressons au S-nitrosoglutathion, capable de libérer du NO au niveau intracellulaire après action d'enzymes membranaires : la gamma-glutamyl-transférase (GGT), la protéine disulfide isomérase (PDI), et la L-aminotransférase (L-AT). Des études *in vitro* sur cellules en culture montrent que les activités de ces enzymes sont modifiées lors de l'inflammation et du stress oxydant. Les objectifs de ce projet sont d'étudier l'impact de l'inflammation et le rôle des enzymes (GGT, PDI, L-AT) sur les propriétés vasorelaxantes du GSNO au cours de l'hypertension artérielle. Cette étude sera réalisée sur des rats mâles spontanément hypertendus (SHR) et leurs contrôles normotendus les rats mâles Wistar Kyoto (WKY) adultes de 20-22 semaines (nombre total d'animaux = 60; 350 g - 450 g). Un régime enrichi en sel (1% dans l'eau de boisson pendant 8 semaines, sans conséquences sur l'état apparent de santé des animaux, la pression artérielle étant à peine augmentée par ce régime) permettra d'exacerber le processus inflammatoire et oxydant vasculaire afin d'en évaluer l'impact sur les effets vasorelaxants du GSNO. Les effets vasorelaxants du GSNO et le rôle des différentes enzymes (utilisation d'inhibiteurs enzymatiques spécifiques) seront évalués *ex vivo* sur aortes isolées. Les niveaux d'activités de la GGT, la PDI et la L-AT seront également mesurés au niveau des aortes prélevées sur d'autres séries de rats prévues à cet effet.

**Raffinement** : les animaux seront utilisés comme donneurs d'organe (aorte thoracique) après anesthésie au pentobarbital et mise à mort par prélèvement sanguin sur l'aorte abdominale. Le nombre d'animaux est *réduit* au minimum par l'utilisation de 8 anneaux aortiques par animal. Il n'est pas possible de *remplacer* l'utilisation des animaux dans cette étude intégrant hypertension artérielle - inflammation et conséquences vasculaires.

Les résultats de cette étude permettront de mieux comprendre les dys-régulations des enzymes du métabolisme du GSNO et leur impact sur ses effets vasorelaxants, en lien avec le processus inflammatoire au cours de l'hypertension artérielle.

3645. *Staphylococcus aureus* représente un enjeu de santé public par sa grande diversité d'infections, sa gravité, sa fréquence mais également en raison de l'émergence régulière de nouvelles souches virulentes. En effet, ces souches présentant une virulence accrue représentent une nouvelle menace en termes de pathogénicité, traitement et prévention de la transmission.

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

Notre équipe de recherche s'intéresse à l'épidémiologie de souches émergentes de *S. aureus* en France au sein de la population humaine ainsi qu'aux facteurs responsables de leur maintien et de leur propagation.

Nous avons récemment identifié un facteur de virulence de *S. aureus*. In vitro (co-cultures de cellules de mammifères et de *S. aureus*), il apparaît que cette protéine inhibe l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, acteur majeur de la réponse immunitaire de l'hôte face à une infection bactérienne. En outre, un modèle d'infection sous-cutanée à *S. aureus* chez la souris nous a permis de mettre en évidence un effet significatif de ce facteur sur la virulence de l'infection bactérienne.

Le but de ce protocole est de confirmer l'effet observé in vivo en augmentant l'effectif d'animaux étudiés ainsi qu'en réalisant une nouvelle procédure expérimentale impliquant une souche bactérienne complémentée du gène exprimant la protéine candidate. Pour cela, le protocole prévoit l'utilisation de 120 souris femelles C57Bl/6. Pour chaque procédure expérimentale, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats interprétables. L'utilisation d'animaux est essentielle pour la réalisation du présent projet et la souris reste un modèle adapté aux types de recherches envisagées. Lors des procédures expérimentales, tout animal montrant une prostration ou une perte de poids supérieure à 20% de son poids sera immédiatement mis à mort.

3646. Les muscles squelettiques sont essentiels pour le maintien de la posture, la mise en mouvement du squelette, la respiration, la thermogénèse, la stabilisation des articulations et la régulation du métabolisme des lipides et des glucides. Le corps humain comprend plus de 600 muscles squelettiques dont la taille varie selon leur fonction. Les muscles striés squelettiques constituent le plus grand organe du corps humain (environ 40% à 50% de la masse corporelle d'un individu sain) et il est le plus grand consommateur d'éléments nutritifs. L'état du tissu musculaire est un facteur crucial dans les maladies cardiovasculaires, le cancer avec la cachexie cancéreuse, le diabète, l'obésité ainsi que l'ensemble des myopathies. La fonction du muscle squelettique est également l'un des facteurs qui limitent la durée de vie, et il joue un rôle central dans le vieillissement. Il a été mis en évidence que des enzymes de modification de la chromatine affectent les voies métaboliques et nos premiers résultats suggèrent un lien entre épigénétique et métabolisme dans le muscle. Dans le but d'étudier les mécanismes physiologiques sous-jacents, nous avons généré des modèles murins chez lesquels certaines protéines de remodelage de la chromatine sont inactivées dans le muscle. Dans le but d'analyser le métabolisme musculaire, nous allons soumettre les souris knock-out à un régime enrichi en graisses pendant 8 semaines. Puis nous analyserons les modifications d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme ainsi que la biochimie sanguine (glycémie, triglycérides, cholestérol, acides gras libres).

#### 2- Retombées attendues

La découverte d'un lien entre épigénétique et régulation du métabolisme est sans précédent et devrait avoir des répercussions bien au-delà de la communauté scientifique. En effet, la compréhension du contrôle du métabolisme dans le muscle pourrait fournir des cibles pharmacologiques intéressantes pour les problèmes de santé publique. Le projet proposé prévoit d'étudier en profondeur les mécanismes moléculaires régulant le métabolisme dans le muscle.

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

**Remplacement:** Bien que nous ayons réalisé des expériences dans les cellules en culture pour investiguer le rôle de régulateurs chromatiniens dans le métabolisme, nous devons désormais utiliser le modèle souris afin d'étudier ce rôle dans des conditions physiologiques. La souris se révèle être un modèle idéal pour étudier le rôle de nos gènes d'intérêt sur le plan physiologique et moléculaire.

**Réduction:** Nous nous proposons d'utiliser le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Pour cela, nous aurons recours à la méthode du "sequential sampling".

**Raffinement:** Les animaux sont hébergés dans une animalerie avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien. Comme les animaux seront isolés, du coton sera ajouté dans la cage. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes seront observés trois fois par semaine (lors de distribution de la nourriture). De plus, nous prendrons le poids corporel des animaux chaque semaine. Pour le prélèvement au sinus rétro-orbitaire, nous utiliserons un collyre à base de tétracaine afin d'anesthésier localement l'œil et réduire au minimum la douleur.

3647. L'incidence des cancers est en constante augmentation. La résection chirurgicale permet de limiter le développement de la tumeur primaire mais l'apparition de métastases, notamment hépatiques, ne permet pas la guérison complète des patients. Le cancer du foie (carcinome hépatocellulaire, CHC) est l'un des 10 cancers les plus fréquents au monde. Avec près de 750 000 cas diagnostiqués chaque année, c'est la 3ème cause de mortalité par cancer. La chirurgie et les traitements proposés actuellement aux patients (radiothérapie et chimiothérapie) ne permettent pas la guérison de ce type de cancer qui entraîne le plus souvent le décès des patients. Il est donc urgent de développer de nouvelles thérapies innovantes.

Pour ce faire, nous voulons développer deux types de modèles pour évaluer de nouvelles thérapies : un modèle orthotopique, c'est-à-dire situé au niveau de son tissu d'origine, de cancer du foie qui permet de mimer la pathologie humaine et de reconstituer les interactions tumeurs et microenvironnement, et un modèle de métastases hépatiques expérimentales. Ces modèles sont largement décrits dans la littérature et permettent de mimer le développement du cancer chez l'homme

Ces modèles seront utilisés pour tester l'efficacité de molécules. Les molécules auront été préalablement sélectionnées à partir de modèles expérimentaux réalisés sur des cellules en culture, ou auront déjà démontré une activité dans d'autre type de cancer, chez la souris ou l'homme. En l'absence de méthodes de substitution ce projet sera effectué sur des souris, considérant la forte homologie biologique avec l'humain, et la facilité de leur manipulation. Une première étape de mise au point sera réalisée pour calibrer les deux modèles en termes de croissance tumorale et de développement de métastases. En conformité avec la règle des 3 R, un calcul d'effectif sera réalisé afin de réduire le nombre de souris nécessaires par groupe et de définir les points limites associés au modèle. Une quantité totale de 3000 souris est estimée sur les 5 ans du projet.

3648. Le glioblastome, tumeur cérébrale touchant les astrocytes (cellules du système nerveux central) est chez l'homme le cancer cérébral le plus fréquent mais également le plus agressif. Son traitement par chimiothérapie par voie systémique implique le passage des molécules à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) afin d'atteindre les zones du cerveau touchées lors du processus cancéreux. Afin de pouvoir valider de nouvelles pistes de traitement le projet a pour but la mise en oeuvre en laboratoire d'un modèle orthotopique de cancer cérébral, consistant en l'implantation dans une structure cérébrale définie de cellules de gliome murin. Ce modèle de tumeur est décrit dans la littérature comme étant un modèle relevant de la pathologie humaine dans lequel le système immunitaire est intact et les interactions tumeur-stroma (tissu en grande partie conjonctif) sont conservées.

Les molécules testées auront été préalablement sélectionnées à partir de modèles expérimentaux réalisés sur des cellules en culture ou auront démontré une activité dans d'autres types de cancer, chez l'homme ou chez l'animal, ainsi que pour leur capacité à passer la BHE. En l'absence de méthodes de substitution, ce projet sera effectué sur des rats, considérant la facilité de leur manipulation et la connaissance de leur comportement ainsi que l'origine de la lignée cellulaire implantée. L'implantation des cellules tumorales dans la structure cérébrale choisie est faite sous anesthésie générale et des mesures seront prises pour prévenir la douleur lors du réveil (administration pré et post opératoire d'analgésique). Une première série d'expériences sera réalisée pour la mise au point du modèle dans laquelle seront évalués la cinétique de croissance de la tumeur et les symptômes associés. En accord avec la règle des 3R, ces données permettront de réaliser un calcul d'effectif afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires par groupe et de définir les points limites du modèle.

Une estimation totale de 2000 rats est proposée sur les 5 ans de validité du projet.

3649. Le but de ce projet est de développer en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) une technique permettant la mesure de la perfusion sanguine placentaire de façon non invasive, en utilisant les propriétés magnétiques du sang (technique appelée Arterial Spin Labelling (ASL)) et en la validant par une autre technique IRM avec une injection de produit de contraste (technique appelée Dynamic Contrast Enhancement (DCE)). Ce travail sera réalisé chez la rate gestante avec un appareil d'IRM dédié petit animal possédant un haut champ (4,7 T). Les rates seront anesthésiées à l'aide d'un gaz (l'isoflurane) pour la réalisation de l'IRM. Cette anesthésie permettra aussi d'éviter les mouvements des rates qui pourraient nuire à la qualité des images d'IRM. Elle permettra également de mettre en place avant l'IRM une perfusion dans une veine pour réaliser l'injection du produit de contraste. Les embryons seront eux aussi anesthésiés à partir de la mère et ne souffriront pas durant l'IRM. Le nombre de rats nécessaire à l'étude sera de 35. Le nombre d'embryons sera de 250 environ. L'IRM n'est pas connue pour être douloureuse mais elle nécessite que le rat soit immobile. Les injections intraveineuses sont réalisées classiquement chez le rat par perfusion au niveau d'une veine de la queue. La mise en place de la perfusion est réalisée sous anesthésie de même que l'injection. Les rates seront euthanasiées à l'issue de la séance d'IRM par surdosage anesthésique sous sédation. Les embryons seront eux aussi anesthésiés à partir de la mère et ne souffriront pas durant l'IRM. Le nombre de rats nécessaire à l'étude sera de 35. Il est d'un grand intérêt de développer de telles techniques pour ensuite les transposer en clinique humaine. En effet, des troubles de la perfusion du placenta sont suspectés lors de la grossesse dans de nombreuses maladies, sans que l'on puisse les dépister par manque de méthodes et donc sans que l'on puisse les traiter.

3650. L'hématopoïèse est un processus conduisant à la production et au renouvellement de toutes les cellules sanguines. Une bonne connaissance des mécanismes moléculaires régulant le développement des différents lignages constitue un enjeu à la fois pour la recherche fondamentale mais aussi pour la recherche translationnelle afin d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des leucémies notamment. Dans ce contexte, le programme de recherche qui sera développé permettra d'identifier et de caractériser les acteurs moléculaires régulant le développement des cellules hématopoïétiques humaines.

Pour aborder cette problématique, nous utiliserons à la fois un modèle murin déficient pour une protéine que nous avons identifiée comme jouant un rôle dans le développement des cellules T et le modèle de souris humanisées NOD.SCID gamma c-/- afin d'identifier de nouveaux acteurs moléculaires. Le modèle de souris humanisées, développé dans les années 2000, est largement utilisé pour aborder l'étude de l'immunologie et de l'hématopoïèse humaines. Il présente l'avantage d'aborder des questions de biologie humaine dans un modèle animal. Cet aspect est tout à fait pertinent car il existe des particularités développementales spécifiques de l'espèce humaine et l'établissement ainsi que la caractérisation d'un modèle d'étude in vivo de l'hématopoïèse humaine s'inscrit dans une perspective visant à construire des modèles précliniques.

Dans le cadre de la règle des 3R, nous réaliserons au maximum des tests in vitro de différenciation hématopoïétique permettant une première validation des acteurs moléculaires avant d'utiliser les modèles d'étude in vivo. Par ailleurs, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés (12 souris par condition d'analyse), nous réaliserons un suivi du développement de l'hématopoïèse humaine par des techniques d'imagerie in vivo, permettant de réaliser une analyse cinétique des mêmes animaux sur une période de plusieurs mois sans les sacrifier. Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux. Nous réaliserons en particulier un suivi quotidien des animaux. Les souris en expérimentation présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique (perte de poids, poils hirsutes, dos voûté, agressivité) seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre maximal de 2100 souris sur une durée de 5 ans.

3651. L'objectif est d'étudier le rôle d'une nouvelle technique d'échographie, l'élastographie shear wave (permettant de mesurer la dureté des tissus) dans l'évaluation précoce de la réponse à la chimiothérapie des cancers du sein. Afin que les résultats soient extrapolables à l'être humain, des fragments de cancer du sein humain (carcinome canalaire infiltrant) seront greffés à 24 souris nues. Ce nombre de souris est le minimum pour pouvoir montrer des différences statistiquement significatives. Les souris seront hébergées tout au long de l'étude dans la quarantaine de l'animalerie du laboratoire et recevront les soins appropriés. La greffe tumorale se fera sous anesthésie générale. Des mesures de dureté dans le plan du plus grand axe de la tumeur seront effectuées au cours de leur croissance. Lorsque les tumeurs auront atteint une taille de 10 mm, les souris seront séparées en deux groupes, l'un recevant un traitement par chimiothérapie (éverolimus®) par voie orale (gavage) et l'autre un placebo (Glucosé à 5%). Des mesures de dureté des tumeurs seront à nouveau effectuées toutes les semaines pendant 4 semaines. Toutes les mesures de dureté se feront sous anesthésie générale. A la fin du traitement les tumeurs seront retirées après mise à mort de l'animal par dislocation cervicale et leurs caractéristiques (fibrose, nécrose, cellularité) histologiques analysées.

Cette étude devrait permettre de préciser le rôle de la dureté comme biomarqueur de la réponse au traitement des cancers du sein.

3652. Les maladies métaboliques telle que l'obésité sont caractérisées par des désordres affectant le métabolisme lipidique et énergétique et sont fréquemment associées à des complications cardiovasculaires liées à l'athérosclérose.

De part leur dimension multifactorielle, avec une composante lipidique et inflammatoire prédominante, ces pathologies affectent plusieurs organes/tissus (paroi artérielle, foie, tissu adipeux) rendant leur prise en charge particulièrement complexe. Il est admis que ces désordres métaboliques constituent un continuum de pathologies qui se développent de façon simultanée (obésité, stéatose hépatique, NASH (nonalcoholic steatohepatitis), fibrose hépatique...). De fait, l'étude de l'ensemble de ces complications doit être abordée de façon globale et intégrée afin de mieux comprendre les voies pathophysiologiques impliquées.

Les macrophages résidents et issus des monocytes circulants sont des cellules immunitaires clés qui contrôlent la dimension lipido-inflammatoire des maladies métaboliques associées à des inflammations chroniques. Toutefois l'orchestration complexe des mécanismes moléculaires engagés dans les macrophages résidents afin de résoudre l'inflammation locale dans un tissu/organe spécifique est encore mal connue.

Le but de ce projet est d'identifier les espèces lipidiques accumulées dans les macrophages résidents tissulaires et de décrypter le programme adaptatif initié par ces cellules. Pour cela, des approches lipidomiques et transcriptomiques seront combinées pour une analyse intégrée des macrophages résidents de la paroi artérielle, du tissu adipeux et du foie dans les différentes pathologies. Cette stratégie innovante nous aidera à identifier de nouvelles voies de signalisation impliquées dans les maladies métaboliques lesquelles pourront représenter de potentielles nouvelles cibles moléculaires en thérapie dans l'athérosclérose et les maladies métaboliques associées aux lipides.

Afin de pouvoir répondre à ces objectifs scientifiques, nous utiliserons le modèle de la souris car il constitue le seul modèle préclinique à l'heure actuelle qui permette d'invalider ou d'induire l'expression de gènes de manière tissu-spécifique et donc de démontrer la fonction de ces gènes. Ce modèle est également incontournable car il a été validé par de très nombreuses études pour la modélisation de l'ensemble du métabolisme glucido-lipidique jusqu'aux aspects pathologiques de développement des maladies métaboliques. Dans le souci de suivre une démarche respectant la règle des 3Rs, une stratégie de production des animaux multi-transgéniques nécessaires à l'étude sera suivie afin de réduire le nombre total d'animaux générés de génotype non désiré et donc sacrifiés. La taille des groupes expérimentaux a été optimisée afin de répondre aux besoins et de mettre en évidence des différences statistiques en prenant en compte les variations liées à chaque type d'expérience.

La réalisation de ce projet sera donc rendu possible grâce à l'utilisation de souris qui seront soumises à des régimes riches en lipides afin d'induire spécifiquement le développement de l'athérosclérose ou des maladies métaboliques telles que l'obésité, la stéatose hépatique, la NASH et la fibrose hépatique. Le nombre requis de souris afin de pouvoir isoler un nombre suffisant de macrophages résidents pour réaliser les études et pour ensuite atteindre la puissance statistique nécessaire pour l'analyse des données est de : 5 régimes X 30 souris = 150 souris. Une étape préliminaire sur un modèle de souris déficient en macrophages recrutés nous permettra de valider les marqueurs spécifiques des macrophages résidents tissulaires (60 souris).

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, la taille des groupes expérimentaux a pu être optimisée et ce grâce à l'expérience du personnel réalisant les procédures expérimentales, ce qui permet de réduire significativement la variabilité des résultats attendus. D'autre part, alors que seuls les mâles sont utilisés au cours du projet car ces derniers sont plus sujets au développement des maladies métaboliques, notamment de l'obésité (prise de poids, formation de masse grasse) et des désordres métaboliques associés (insulino-résistance, stéatose hépatique..), les femelles générées seront en revanche utilisées dans le cadre d'autres projets menés au sein de la plateforme d'hébergement (CEF). Enfin, dans la mesure du possible les animaux seront explorés de manière extensive afin de limiter le nombre de groupes expérimentaux nécessaires pour la réalisation du projet.

Le décryptage des programmes d'activation des macrophages résidents tissulaires en réponse aux stressés lipidiques induits par les différents régimes permettra l'identification de gènes d'intérêts qui seront ensuite testés dans des modèles de souris dont l'expression de ces gènes sera spécifiquement invalidée dans les macrophages. L'étude de chaque gène nécessitera l'utilisation d'environ 30 souris (60 pour les gènes 1 et 2). Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous nous limiterons à l'étude de 10 gènes d'intérêt, soit 360 souris (Gène 1 = 30 + Gène 2 = 30 + Gènes 3-10 = 7 x 30 = 210 souris). Le nombre total de souris nécessaires pour l'ensemble de ce projet sera donc de 570 (150 + 60 + 360).

3653. Les rétinopathies ischémiques prolifératives peuvent résulter de différentes pathologies comme l'occlusion veineuse rétinienne (OVR), le diabète ou la prématurité. Des remodelages microvasculaires (RMV) peuvent être la cause d'occlusion capillaire et d'ischémie de la rétine. Suite à la phase ischémique une dégénérescence vasculaire et neuronale s'installe, par une de formation des nouveaux vaisseaux sanguins pathologiques. Ces nouveaux vaisseaux sont en excès et ne garantissent pas une circulation sanguine correcte, et peuvent finalement entraîner une cécité irréversible dont les mécanismes restent à élucider. Actuellement il n'existe pas des traitements efficaces pour les formes les plus sévères de la maladie et pour retarder la progression vers la cécité du patient. Dans le laboratoire nous avons développé et patenté une famille de peptides capables d'inhiber la formation de nouveaux vaisseaux. Nous voulons tester les effets de ces molécules et étudier si elles peuvent avoir un effet inhibiteur sur le développement et la progression de la rétinopathie ischémique induite par l'oxygène chez la souris. Ce modèle de maladie de la rétine induite chez la souris mime les caractéristiques des rétinopathies humaines et donc les résultats pourront être utilisés pour développer un traitement de la rétinopathie humaine. Dans ce projet nous allons prendre toutes les mesures nécessaires à respecter la règle de 3R de l'expérimentation animale : nous avons réduit le nombre des animaux grâce au développement des techniques sophistiquées d'analyse quantitatives ; nous avons raffinée les techniques pour suivre le bien être animale et nous avons Ce projet prévoit d'utiliser 400 animaux et .nous menons des études pour essayer de remplacer les modèles animaux.

3654. Ce projet de recherche vise à améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires associés à l'apparition et au développement de maladies humaines complexes tels que le diabète de type 2 (DT2) et l'obésité en disséquant l'importance de protéines impliquées dans la transcription des gènes (coactivateurs transcriptionnels de la famille des protéines p160 (SRC-1, SRC-2 et SRC-3) dans le métabolisme.

Nous avons d'ores et déjà pu montrer, au travers de publications récentes que le coactivateur SRC-1 jouait un rôle critique dans le métabolisme glucidique et lipidique in vitro et in vivo, notamment dans le foie en contrôlant des gènes clés de la production endogène du glucose (gluconéogenèse), de la beta-oxydation des acides gras et de l'utilisation des acides aminés. Nous allons maintenant essayer de caractériser l'importance de cette protéine dans les mécanismes moléculaires strictement associés aux désordres métaboliques de maladies complexes comme le DT2, l'obésité et durant le vieillissement en utilisant des souris génétiquement modifiées déjà disponibles. Cette étude de recherche fondamentale a pour but in fine de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques que sont les coactivateurs transcriptionnels SRCs. Au final ce projet présentera un rapport avantages/dommages positif puisqu'il doit contribuer à améliorer nos connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans des maladies métaboliques aux effets délétères prononcées chez l'homme que sont le DT2 et

l'obésité avec en perspective de nouvelles approches thérapeutiques tout en utilisant, (i) un modèle de souris établi (fond génétique pur C57Bl6) qui ne présente pas de phénotypes dommageables et (ii) des procédures expérimentales qui n'affectent que faiblement les conditions de vie des animaux (iii) et un nombre d'animaux peu élevé puisque seulement 260 souris seront utilisées.

3655. L'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) est une hormone produite par le foie. Au niveau musculaire, cette molécule stimule la régénération et l'hypertrophie musculaire. Au niveau central, elle stimule l'angiogenèse, la neurogenèse, induit une plasticité synaptique, améliore les fonctions cognitives... Les taux d'IGF1 sont modulés par l'activité physique : ils diminuent au cours du vieillissement, dans des pathologies neurodégénératives, ou plus simplement lors d'une période d'inactivité. Nous pensons que la restauration de taux normaux d'IGF1 lors d'une période d'hypoactivité pourrait aider à prévenir d'une part les effets délétères de cette dernière sur le système nerveux, et d'autre part les perturbations qui en découlent, telles que les chutes, et leurs conséquences : pertes d'autonomie, altération de la qualité de la vie, augmentation de la morbidité et de la mortalité.

L'étude des interactions entre l'hypoactivité et l'application d'une substance (IGF1) nécessite d'utiliser 6 groupes de rats. Trois études seront réalisées pour chacun de ces groupes, afin d'évaluer la fonction sensorielle, motrice, et le comportement. Le nombre d'animaux par groupe, déterminé par une analyse de puissance, est estimé à 10 rats. Ce nombre a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisants (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles). En comptant en outre quelques animaux pour optimiser chacun des protocoles expérimentaux, nous estimons le nombre total d'animaux nécessaires à 204 au maximum. Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales seront réalisées en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux.

3656. La période périnatale est une fenêtre critique du développement au cours de laquelle différents stress (nutritionnel, inflammatoire, infectieux...) pourraient conditionner la survenue de pathologies à l'âge adulte. Ce serait le cas du syndrome de l'intestin irritable, caractérisé par un inconfort digestif, des douleurs abdominales récurrentes et des troubles du transit. Les modèles d'étude de cette pathologie montrent qu'une exposition néonatale à un stress chronique induit à long terme une susceptibilité aux troubles des fonctions digestives en réponse à un stress aigu. L'objectif principal de l'étude est de déterminer l'impact d'une dénutrition périnatale sur la maturation du système nerveux entérique, sur l'acquisition des fonctions digestives, et sur la susceptibilité à développer une pathologie de type syndrome de l'intestin irritable. Dans un modèle de rat avec retard de croissance intra-utérin (RCIU) dû à une alimentation de la mère appauvrie en protéine, les caractéristiques de maturation du réseau neuro-glial seront étudiées sur des cultures primaires de neurones entériques et sur l'intestin de rat. Cette étude sera complétée par un protocole permettant de tester si le stress nutritionnel de dénutrition périnatale induit une susceptibilité accrue à développer des troubles digestifs chez l'adulte suite à un stress aigu d'évitement de l'eau (water avoidance stress). Pour cette étude, un nombre total de 26 rates gestantes et de 84 rats seront utilisés. Le protocole expérimental est défini pour limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés et pour assurer un raffinement des conditions de vie des rats durant toute la durée expérimentale.

3657. L'ischémie du myocarde est une pathologie cardiovasculaire très répandue qui est à l'origine de dysfonctions vasculaires et contractiles du myocarde, d'arythmies et d'infarctus.

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

Cette situation clinique, qui ne peut être modélisée in vitro, est créée chez les animaux afin de tester sur ces modèles de nouveaux candidats médicament. La dysfonction ventriculaire qui en résulte est mesurée au moyen d'imagerie clinique, méthode non invasive, ou de mesures hémodynamiques. Ces examens permettent de mesurer finement les effets d'un candidat médicament et ainsi de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Le lapin sur lequel est modélisée l'insuffisance cardiaque au cours d'une intervention sous anesthésie générale est un bon modèle d'insuffisance cardiaque post-infarctus puisqu'il présente l'avantage d'une meilleure maniabilité que le porc et démontre également une plus grande pertinence clinique que les rongeurs puisque les lagomorphes sont plus proches de l'homme que les rongeurs. De plus, le lapin permet de combiner l'insuffisance cardiaque avec un cofacteur prépondérant ; l'hypercholestérolémie. En effet, l'hypercholestérolémie peut être observée chez une souche à mutation spontanée, le lapin Watanabe Heritable Hyperlipidemia (WHHL), ou chez une souche normale (New Zealand) alimentée avec un régime hypercholestérolémique pendant plusieurs semaines. Ainsi, le modèle d'insuffisance cardiaque, couplé à l'hypercholestérolémie, permet de tester les produits candidats ayant, par exemple un effet athéroprotecteur attendu. L'hébergement des animaux se fait en cage individuelle à laquelle est intégrée une tablette support et enrichie de balles et rondins de bois. Ce projet utilisera environ 150 animaux sur une durée de 5 ans.

3658. Le prolapsus génital est une préoccupation de santé publique importante et concerne un tiers des femmes de tout âge. De nombreuses techniques chirurgicales de corrections des prolapsus ont été élaborées, par voie vaginale ou abdominale. La chirurgie par voie vaginale est associée à des taux de récives compris entre 30 à 50% en cas de chirurgie avec tissus autologues et de 7% en cas de pose de matériel prothétique.

Une classification des prothèses en fonction de leur grammage a été proposée par Earle et al. en 2008 : prothèses lourdes (>80 g/m<sup>2</sup>), de poids moyen (50-80 g/m<sup>2</sup>) ou légères (<35 g/m<sup>2</sup>). En matière de chirurgie herniaire par voie abdominale, une étude publiée il y a 15 ans, soulignait déjà que la réduction du grammage, de 95 à 55 g/m<sup>2</sup>, permettait une réduction de la réaction inflammatoire et du taux de rétraction de la prothèse, de 46 à 34%. Une essai clinique randomisé récent, toujours en chirurgie herniaire, ayant comparé une prothèse légère (35 g/m<sup>2</sup>, Timesh®) à une prothèse de poids moyen (75 g/m<sup>2</sup>, Parietex®), a retrouvé une réduction des douleurs post-opératoires et un retour plus rapide aux activités dans le premier cas, sans augmentation du risque de récive herniaire à deux ans. Très peu d'étude clinique utilisant des prothèses légères par voie vaginale n'ont encore été publiée.

Après plusieurs années de recherche expérimentale, nous avons développé une prothèse composite polypropylène (PPL) / acide polylactique (PLA) dont le cahier des charges répond aux problématiques de manipulation chirurgicale, de biocompatibilité et de résistance biomécaniques in vitro.

L'hypothèse que nous souhaitons tester dans l'étude actuelle est qu'une prothèse composite PPL / PLA a des propriétés biomécaniques in vivo compatible avec un traitement des éventrations abdominales à la fois efficace et bien toléré.

Le choix d'utilisation du modèle de rat est lié aux travaux précédemment menés et à l'expérience de l'équipe.

Concernant le nombre d'animaux et en regard de la littérature et des hypothèses testées, nous avons choisis de constituer des groupes de 7 rats pour les analyses précoces (2 semaines et 3 mois) et 10 rats pour les analyses tardives (6 mois), soit 72 animaux au total.

Les mesures prises pour respecter la règle des 3R sont :

- Réduction : le nombre de rats utilisés (72) a été considéré comme le nombre minimum nécessaire par les statisticiens afin de pouvoir répondre aux hypothèses de l'étude

- Remplacement : les trois temps d'expérimentation (15, 90 et 180 jours) sont nécessaires pour étudier l'évolution des propriétés biomécaniques pendant la période de dégradation du PLA. Cette étude ne peut pas être réalisée in vitro et il n'existe aucune technique de substitution.

- Raffinement : Concernant les conditions d'enrichissement, les rats disposeront dans leurs cages individuelles de TOP BRICK qui sont des modules de cœur de bois de peuplier qui permettent de développer l'activité d'exploration de l'animal et de participer à son bien-être.

3659. La O-N-acétylglucosaminylation ou O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle de nombreuses protéines (cytosoliques et nucléaires). Cette modification est dynamique et réversible, consistant en l'addition d'un monosaccharide, le N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le résidu hydroxyle (OH) d'une sérine (Ser) ou d'une thréonine (Thr) de l'axe peptidique des protéines. Cette glycosylation particulière est régulée par un couple d'enzymes spécifiques : la O-N-Acétylglucosaminyltransférase (OGT) qui catalyse le transfert de GlcNAc sur la protéine à partir du substrat nucléotide-ose UDP-GlcNAc. La seconde enzyme clé du processus est la O-N-Acétylglucosaminidase (O-GlcNAcase ou OGA) qui catalyse la dé-glycosylation de la protéine via l'hydrolyse du résidu O-GlcNAc.

Des travaux antérieurs conduits au sein de notre équipe de recherche ont permis de démontrer que la O-GlcNAcylation était un modulateur important de l'activité contractile des fibres musculaires in vitro traitées avec un inhibiteur de l'OGA. L'objectif de ce projet est d'évaluer si, des modifications aiguës (modérées ou importantes) ou chroniques des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines musculaires sont susceptibles de modifier les propriétés fonctionnelles in vivo du muscle strié squelettique. L'objectif à terme sera d'établir si cette modification post-traductionnelle peut être un modulateur de l'activité contractile au cours de l'exercice physique qu'il soit aigu (exercice unique) ou chronique (procédure d'entraînement).

Pour réaliser ce projet, 60 souris mâles de souche C57/BL/6, âgées de 4 à 6 semaines et de statut sanitaire conventionnel seront utilisées. Ces animaux seront hébergés en environnement conventionnel pendant toute la durée du projet et seront distingués en 5 groupes: 3 groupes seront traités de manière aiguë (injection unique) ou chronique (14j de traitement) avec un inhibiteur de l'OGA; 2 serviront de groupes contrôles respectivement pour les animaux traités soit de manière aiguë soit de manière chronique.

Le choix de l'utilisation d'un modèle de souris mâles est basé sur les résultats récents de la littérature ayant montrés l'efficacité du traitement ici proposé pour augmenter le niveau de protéines musculaires-O-GlcNAc. Pour chacun des groupes constitués, le nombre d'animaux (n=12 par groupe) a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de résultats satisfaisant (différences statistiquement observables entre les animaux traités et les animaux contrôles).

Dans tous les cas, l'ensemble des procédures expérimentales réalisées (n°1: Augmentation du niveau des protéines musculaires O-GlcNAc, n°2: Etude in situ de l'activité musculaire et/ou nerveuse des membres inférieurs et n°3: Prélèvement des muscle EDL et soleus pour analyse biochimique) seront réalisés en limitant au maximum (durée et intensité) toute douleur et/ou stress pour les animaux utilisés. Ainsi, les injections réalisées au cours de la procédure expérimental n°1 seront réalisées à partir d'une contention maximale d'une durée de 30 secondes. Les procédures n°2 et n°3 seront systématiquement réalisées sous anesthésie profonde pour ne pas induire de souffrance pour les animaux utilisés. Etant donné le caractère invasif des expérimentations 2 et 3, les animaux seront mis à mort à la fin de la procédure n°3.

3660. Les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité et de morbidité dans la population diabétique. Parallèlement aux complications cardiovasculaires spécifiques plus connues sous le terme de cardiomyopathie diabétique, les patients diabétiques présentent un risque cardiaque et une susceptibilité aux situations ischémiques plus importants que la population générale. En effet, le diabète augmente de façon importante le risque de survenue d'événements ischémiques cardiaques (arythmie, infarctus du myocarde, mort subite) dans diverses situations et notamment dans le cadre de l'exercice physique lorsque celui ci est pratiqué de façon isolée et/ou intensive. En effet, si l'activité physique régulière est reconnue pour son habilité à limiter la progression des complications diabétiques, la réalisation d'exercices isolés représente un certain niveau de stress et un facteur de risque de survenue d'événements cardiaques. Ainsi, pour limiter le risque cardiaque et permettre la pleine intégration de l'activité physique régulière dans la prise en charge thérapeutique du diabète, il est nécessaire de développer des stratégies cardioprotectrices contre les dommages ischémiques induits par la réalisation d'exercices physiques isolés (tests d'évaluation du potentiel physique, première séance du programme d'entraînement, reprise de l'activité après plusieurs jours d'interruption). L'utilisation d'un préconditionnement physique ou d'une supplémentation en n-3 PUFA (omega 3) en tant que stratégies cardiosensibilisatrices, constitue le point particulièrement innovant de ce projet, afin de protéger le myocarde diabétique contre les dommages ischémiques induits par l'exercice isolé. Pour atteindre nos objectifs, nous ne pouvons utiliser que des modèles in vivo où les animaux seront rendus expérimentalement diabétiques. Le modèle de diabète induit par injection de streptozotocine est un modèle de référence pour l'étude expérimentale du diabète de type 1 et récapitule de manière intéressante les principales étapes qui caractérisent la pathologie humaine. Dans ce projet, nous avons prévu d'utiliser 60 rats dans le respect de la règle des 3 R « Réduire, Raffiner, Remplacer ». Les cohortes seront constituées de 10 animaux par groupe (6 groupes : Sain et diabétique – contrôle, sain et diabétique – préconditionnement physique, sain et diabétique – supplémentation en n-3 PUFA) afin d'obtenir un nombre de sujets suffisants pour juger de l'intérêt de nos stratégies cardioprotectrices. La taille de l'échantillonnage de chaque groupe a été définie à partir d'un test statistique afin d'obtenir des résultats exploitables et significatifs. Plusieurs points limites ont été définis pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet (perte de poids trop importante, accidents sur le tapis roulant, maladie). Ces recherches associées à des études chez l'Homme, participeront, à plus long terme, à l'élaboration de recommandations précises en matière d'activité physique adaptée et de stratégies nutritionnelles.

3661. La présente demande est rédigée dans le but d'immuniser des souris contre la protéine VHL172 afin d'obtenir des anticorps monoclonaux spécifiques.

La protéine VHL172, traduite à partir d'un variant d'épissage du gène VHL suppresseur de tumeur, est potentiellement impliquée dans différentes processus de tumorigenèse, dont la tumorigenèse rénale. Les études de biologie moléculaire ont Dossier-N°02501.01 montré que le gène VHL est associé le plus souvent à des grades élevés de tumeurs (i.e. de mauvais pronostic) dans le cancer du rein mais également

pour d'autres types de cancer tels que le cancer de la thyroïde et le cancer du sein. L'objectif de l'obtention de cet anticorps est de pouvoir caractériser précisément l'expression de la protéine VHL pour comprendre son rôle dans la genèse et/ou l'évolution de la tumeur. En effet, il n'existe pas actuellement d'anticorps commerciaux et/ou publiés dans la littérature qui reconnaissent spécifiquement la protéine VHL172. Ainsi, il est indispensable d'obtenir l'outil rapidement afin de répondre aux questions biologiques suivantes :

a) relation entre expression de la forme VHL172 et l'agressivité tumorale ?

b) rôle de cette protéine dans le processus de tumorigenèse,

Pour la partie expérimentation animale, deux stratégies d'immunisations seront réalisées en parallèle, et une troisième sera envisagée en fonction des résultats obtenus. La première approche va consister à immuniser des lots de 6 souris à l'aide de la protéine VHL172 sous forme recombinante, entière ou tronquée. L'utilisation de peptides couplés entre eux sera réalisée dans une seconde approche. Cette méthode innovante permet de s'affranchir de l'utilisation de protéine porteuse généralement nécessaire lors de l'utilisation de peptide. Elle offre également l'avantage de réduire les réponses non spécifiques liées à l'utilisation de protéine (ex. développement d'anticorps anti-protéine porteuse). En cas d'échec de ces deux stratégies, c'est-à-dire en absence d'obtention d'anticorps anti-VHL172 spécifique, l'injection alternée de peptides et de protéines recombinantes sera testée dans une troisième approche.

Toutes les immunisations seront préférentiellement réalisées par voie sous-cutanée, suivant un cycle de trois injections espacées de 15 jours. A l'issue de la dernière injection, des prélèvements sanguins sous-maxillaires chez chaque animal seront réalisés pour contrôler le développement d'une réponse immunitaire spécifique. En fonction des titres sériques mesurés, un ou plusieurs animaux seront sélectionnés pour les étapes in vitro du projet. En cas de développement d'une réponse immunitaire insuffisante, la stratégie employée sera réévaluée, ou des cycles supplémentaires d'injections seront réalisés.

Pour ce projet, le nombre maximal d'animaux prévu est de 108 souris, 54 souris Balb/c et 54 souris Swiss. En effet, 2 molécules par procédure pourront être testées pour induire une réponse immunitaire spécifique, chacune injectée à deux lots de six souris. Pour la troisième procédure (injection alternée de peptide et de protéine), un lot unique de six souris est prévu. Chaque nouveau lot ou changement d'espèce ne sera réalisé qu'en l'absence de résultat concluant (obtention d'anticorps spécifiques), ceci afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire au projet. Par ailleurs, tous les résultats d'immunisation sont consignés dans un fichier. Ce document permettra une analyse rétrospective des expériences réalisées afin d'améliorer les protocoles d'immunisation, et in fine le nombre d'animaux nécessaire par projet. Après l'obtention de lignées établies d'intérêt, les animaux restants sont euthanasiés dans le respect des bonnes pratiques éthiques.

3662. L'insuffisance cardiaque (IC), incapacité progressive du cœur à fournir un débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques d'un individu dans la vie courante, est la seconde cause de mortalité dans les pays occidentaux et les Etats-Unis. La réponse définitive au problème d'insuffisance cardiaque est le rétablissement du débit cardiaque. Or, à ce jour, les traitements médicamenteux ou électroniques sont peu efficaces, trop restrictifs et coûteux. Quelques données chiffrées symboliques.

- 75 % des coûts de la prise en charge de l'insuffisance cardiaque sont liés aux hospitalisations ;

- Le coût moyen par séjour à l'hôpital est de l'ordre de 10 000 € ;

- 24 % des patients sont ré-hospitalisés dans les 12 semaines qui suivent un premier séjour ;

- 1 patient sur 5 décède dans l'année qui suit le diagnostic ;

- Moins de 15 % des patients survivent au-delà de 8-10 ans.

Notre projet est d'expérimenter un nouveau type de mini-pompe cardiaque dénommée « I.C.O.M.S. » (Implantable Cardiac Output Management System) que nous avons mis au point et qui a pour objectif d'augmenter la performance d'éjection ventriculaire de 30 à 60% à chaque cycle cardiaque chez les patients en insuffisance cardiaque sévère. Ainsi, l'accélération du débit d'éjection raccourcit la phase de contraction, offrant plus de temps au remplissage du cœur et une irrigation myocardique plus performante. Le propulseur, développé en partenariat avec un Institut de Recherche de renommée internationale et d'une plateforme spécialisée, offre des avantages importants par rapport aux procédés existants. En effet, sa petite taille et son autonomie permettent d'appliquer une technique chirurgicale simple et brève sans mise en place d'une circulation sanguine extracorporelle, de s'affranchir d'une alimentation électrique externe, ce qui représente un changement radical dans le devenir et la qualité de vie des patients insuffisants cardiaques sévères.

Postulat de base : La réponse définitive à l'insuffisance cardiaque est le rétablissement du débit sanguin.

Pour y répondre, le système utilisera un impulseur rotatif implanté dans le cœur par thoracotomie, situé à l'apex (la pointe) du ventricule gauche et si nécessaire un second impulseur rotatif situé à l'apex du ventricule droit. Ces deux impulseurs sont connectés à une batterie placée dans la région épigastrique. Le moteur respectif des impulseurs est associé à une électrode de stimulation/détection, le tout fixé sur l'épicarde (par thoracoscopie ou mini-thoracotomie). C'est un système fermé sans extériorisation de matériel électrique ni d'alimentation

Les différents objectifs des essais animaux :

1] Amélioration hémodynamique par la mise en action de la turbine, sur un cœur à fraction d'éjection basse

2] Concept d'implantation totalement étanche au sein du ventricule gauche

3] Synchronisation d'une turbine intra-cardiaque avec la systole ventriculaire

Le projet nécessitera l'utilisation de 30 animaux, le modèle choisi est le mouton qui permet de reproduire des résultats qui seront applicables chez l'Homme, l'utilisation d'animaux ne peut être remplacée dans le cadre de notre étude car il n'est pas possible de remplacer les essais in-vivo pour reproduire la physiologie complexe d'un corps entier. Le nombre défini est le minimum pour pouvoir tester l'ensemble des paramètres permettant de valider le dispositif. Enfin, tout au long de la réalisation de l'expérimentation, toutes les mesures seront prises pour répondre au bien-être des animaux, les expérimentations étant terminales, celles-ci seront principalement mises en place lors de la prise en charge des animaux.

3663. La myosite d'effort (ou "RER") est un syndrome d'apparition intermittente, caractérisé notamment par des tremblements, une fermeté anormale des muscles locomoteurs et une douleur intense et aiguë. La prévalence estimée est de 5 - 9 % de l'ensemble des chevaux à l'entraînement. Il a également été récemment montré que 24% des chevaux de sport ne performant pas au niveau escompté souffraient de formes subcliniques de RER. La fréquence des formes subcliniques (15,2%) de RER serait 5 fois plus élevée que celle des formes cliniques (2,9%). De plus, certaines études montrent qu'il existe des facteurs génétiques associés à la RER.

Malgré l'importance majeure (éthique et économique) des RER, les outils disponibles pour le diagnostic de cette affection sont encore très limités. Actuellement, le diagnostic de RER repose principalement sur le dosage sanguin de différentes enzymes musculaires ; il est peu sensible et relativement tardif car seule une large augmentation, signant une sévère souffrance des cellules musculaires, permet d'établir l'existence d'une myopathie.

Afin de mieux gérer les animaux sensibles aux RER et de prévenir les conséquences néfastes de la maladie, les professionnels de la filière équine auraient besoin d'une méthode fiable, précoce, rapide et non-invasive de détection de la fatigue musculaire et d'identification des myosites subcliniques chez le cheval athlète.

L'étude proposée a donc pour objectifs de déterminer des biomarqueurs sanguins et musculaires précoces, spécifiques et pertinents de RER tant au niveau protéomique que génomique. A terme, elle pourrait permettre d'identifier des voies de régulation anormales chez les RER et de cerner les gènes supports de la maladie.

Pour cela, vingt-quatre chevaux Trotteurs Français, douze chevaux "RER" et autant de chevaux appariés sains, seront systématiquement examinés dans le cadre de leur entraînement. L'étude s'effectuera en 3 temps :

- une étude de type "cas - témoin" : des prélèvements sanguins et des microbiopsies musculaires seront analysés en génomique, protéomique et métabolomique afin de déterminer le profil pathologique ponctuel de chevaux "RER" et ainsi d'en identifier les potentiels biomarqueurs diagnostiques.

- une étude de type "longitudinale" : des prélèvements sanguins et musculaires seront réalisés sur les mêmes chevaux à plusieurs reprises au cours de la saison d'entraînement. L'évolution comparée des biomarqueurs chez les chevaux RER à l'entraînement par rapport aux chevaux sains au cours du temps devrait conduire à l'identification de biomarqueurs prédictifs constituant un "profil pathologique". Celui-ci pourrait permettre la suspicion / le dépistage des RER, même en l'absence de signe clinique ou d'anomalie identifiable par les méthodologies diagnostiques actuelles.

- une étude in vitro : les cellules musculaires issues des microbiopsies seront également mises en cultures pour analyses de génomique fonctionnelle in vitro lors de prolifération et différenciation cellulaire, afin d'identifier les dysfonctionnements notamment au niveau mitochondrial et régulation calcique.

Le nombre d'animaux est limité au strict nécessaire pour obtenir réaliser une analyse statistique pertinente (réduction). Les animaux utilisés sont des chevaux à l'entraînement ou à l'élevage et le protocole, peu invasif, n'apporte aucun changement à leur vie (raffinement). Des études in vitro ont été réalisées en amont et le seront en aval de cette étude afin de limiter au strict minimum les étapes sur animal vivant (remplacement).

3664. Notre projet vise à étudier le rôle de l'inflammation cérébrale (« neuroinflammation ») dans la maladie de Parkinson (MP). Cette neuroinflammation se traduit notamment par une réactivité des cellules immunitaires sanguines et cérébrales. Parmi ces populations de cellules, nous avons choisi d'étudier les monocytes circulants qui peuvent soit infiltrer le tissu cérébral et devenir des « macrophages cérébraux », soit prendre place le long des vaisseaux sanguins cérébraux pour se transformer en « macrophages péri-vasculaires ». L'utilisation d'un système "in vivo" est nécessaire pour étudier les interactions entre le système immunitaire et le système nerveuse. L'espèce qui représente le meilleur modèle animal pour étudier les mécanismes fondamentaux de la maladie de Parkinson et la souris. Donc, en utilisant des modèles souris de la maladie, nous chercherons à déterminer 1) l'importance de ces processus migratoires ainsi que 2) leur rôle bénéfique ou délétère sur la mort neuronale au cours de la MP.

Type d'animaux : Souris adultes

Nombre d'animaux : Nous allons utiliser plusieurs lignées de souris transgéniques (qui sont inactivées pour un gène ou qui sur expriment un gène spécifique) pour

a) mieux identifier les différents types de cellules immunitaires (lignées rapportrices fluorescentes) et pour

b) déterminer le rôle des monocytes circulants dans un modèle souris de la MP.

Nous estimons utiliser 560 souris par an pour 5 ans.

Résultats attendus et problèmes possibles : Ce projet devrait permettre d'identifier des nouvelles voies potentiellement neuroprotectrices pour la MP. La translation des résultats obtenus chez les souris vers l'homme nécessite, bien sûr, d'études supplémentaires, dont l'analyse des tissus postmortem des patients.

Remplacement-Réduction-Raffinement :

Remplacement: Pour avoir un modèle relevant de la MP, qui est capable de reproduire les interactions entre neurodégénérescence et réponse neuroinflammatoire, nous avons besoin d'un système qui contient toutes les différentes types cellulaires impliquées dans ce processus pathologique (neurones, cellules gliales, cellules immunitaires). Il est donc absolument nécessaire d'utiliser un système in vivo, comme le modèle souris de la MP.

Réduction: Nous allons utiliser le nombre des animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Si possible, nous allons acheter les souris transgéniques directement chez des fournisseurs agréés pour réduire la génération des animaux surplus.

Raffinement: L'utilisation de nouveaux armoires chauffantes, pour héberger les souris, nous permet d'optimiser le modèle souris de la MP (injection d'une neurotoxine) en réduisant fortement les effets secondaires indésirables (comme la hypothermie).

3665. Les troubles neuropsychiatriques affectent près d'un milliard de personnes dans le monde. L'allongement de la longévité est un facteur de risque majeur à l'augmentation de ces maladies. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent. De ce fait, les conséquences économiques et sociales sont très significatives. Les maladies neuropsychiatriques les plus connues sont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la schizophrénie et la dépression.

Il est possible de sélectionner, sur la base d'une veille scientifique, les facteurs génétiques, environnementaux ou pharmacologiques susceptibles de contribuer ou reproduire certains aspects d'une pathologie neuropsychiatrique. Des modèles sont disponibles chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), dans la majorité des cas génétiquement modifiés. Les études sur ces modèles consistent alors à :

1) caractériser à différents stades de développement (de 48h post-fécondation au stade adulte), le degré d'atteinte fonctionnelle sur le plan morphologique, comportemental et biochimique/histologique.

2) évaluer la capacité à reverser les phénotypes observés par des candidats médicaments.

La recherche de nouveaux médicaments en neuropsychiatrie repose sur une première étape d'identification de molécules efficaces sur leur cible au moyen de tests in vitro. Mais l'efficacité thérapeutique d'une molécule ne peut être démontrée qu'après administration chez l'animal. Il est donc nécessaire que les molécules les plus abouties et les plus avancées dans leur développement soient administrées in vivo. Les modèles de poisson zèbre, à l'interface des modèles cellulaires ou invertébrés (*C. Elegans*, *Drosophila*) et des modèles vertébrés plus évolués (rongeurs, primates) s'avèrent adaptés à cette étape. Ils constituent un bon compromis entre nos besoins de moyens à haut débit dans les études de screening et la nécessité d'utiliser un système in vivo à la physiologie la plus proche possible de celle de l'homme.

Le poisson zèbre est un animal de petite taille, à forte fécondité, au développement embryonnaire externe très rapide, transparent, et perméable aux petites molécules. De plus, son génome, aujourd'hui complètement séquencé, possède une forte homologie avec celui de l'homme (71% des gènes humains ont au moins un orthologue chez le poisson zèbre). L'homologie physiologique avec les mammifères est également élevée, avec notamment conservation de l'organisation du cerveau et des neurotransmetteurs. Des similitudes dans le répertoire comportemental existent également (réponses conditionnées, comportement social, mémoire,...). Enfin, le poisson zèbre est facilement manipulable génétiquement (suppression/surexpression de gènes de façon transitoire, constitutive ou inductible), avec la possibilité de conserver les lignées par congélation du sperme.

Les modèles poisson zèbre se justifient en regard avec l'application de la règle des 3R :

- Au niveau inter-espèce : il doit permettre de réduire le nombre d'animaux vertébrés supérieurs (rongeurs) qu'il faudrait utiliser pour atteindre les mêmes objectifs. In fine, le poisson zèbre pourrait remplacer le rongeur dans certaines études.

- Au sein même de l'espèce : la larve peut remplacer l'adulte dans un grand nombre d'étude.

En début de projet, 100 % des études utiliseront des larves de 5 jours post-fécondation (jpf) ou moins, c'est-à-dire à des stades de développement sans besoin d'apport alimentaire extérieur : ces larves ne rentrent donc pas dans le cadre légal de l'expérimentation animale (directive 2010/63/EU, Art. 1.3.a.i.). Les études sur individus de plus de 5 jpf seront introduites progressivement pour atteindre 30 % des effectifs dans 5 ans.

La mise en place d'une étude sur les poissons de plus de 5jpf se justifie par le besoin de développer des modèles se rapprochant d'avantage de la physiopathologie chez l'homme (par exemple : modèle de poissons transgéniques inductibles pour mimer l'apparition d'une neuro-dégénération tardive). Les études sur poissons de plus de 5jpf seront introduites progressivement dans le projet et lorsque suffisamment de données seront réunies, elles feront l'objet de consultations statistiques pour réajuster si besoin le nombre d'animaux nécessaire. Dans certains cas, il est possible de combiner deux procédures expérimentales avec les mêmes animaux, ce qui divise ainsi le nombre total d'animaux utilisés par deux. Par exemple, une étude morphologique, histologique ou une mesure biochimique peuvent être réalisées à la suite d'une étude comportementale ou de mesure de l'activité locomotrice. Par ailleurs, dans les études histologiques ou de dosages biochimiques, un même animal peut servir à plusieurs mesures.

Finalement, la congélation du sperme et la fécondation externe permettent d'entretenir des lignées transgéniques ou mutantes tout en limitant le nombre de poissons mis à l'élevage.

Le nombre d'animaux de plus de 5 jpf prévu par étude est d'une centaine et on suppose pouvoir réaliser une centaine d'études sur 5 ans. Ainsi, sur la durée du projet prévue pour 5 ans, environ 10000 poissons seront utilisés, selon la répartition suivante : 1/3 des animaux pour l'étude des fonctions comportementales, locomotrices et morphologiques ;

1/3 des animaux pour les études histologiques ;

1/3 animaux pour les dosages biochimiques.

Des larves âgées de moins de 10 jpf, et des juvéniles (de 30 jours à 3 mois), seront utilisées dans l'ensemble des procédures ; des poissons adultes (supérieurs à 3 mois) seront utilisés essentiellement pour l'étude des fonctions comportementales.

Le projet est de degré de gravité modéré, pour un objectif thérapeutique important chez l'homme.

3666. La préservation et le maintien du capital musculaire squelettique est un enjeu important dans le maintien d'un état de bonne santé mais également en terme de dépense de santé publique. En effet, le muscle squelettique représente le principal réservoir d'acides aminés (AA) pouvant être mobilisés pour assurer l'homéostasie et la survie de l'organisme en cas de situations pathologiques ou d'événement agressif.

La perte du capital musculaire, quelle que soit son origine (pathologique ou vieillissement), résulte d'un déséquilibre entre la vitesse de synthèse et de dégradation des protéines du muscle squelettique. Si les causes peuvent être différentes, il a été systématiquement observé une diminution de l'effet anabolique du repas (accrétion protéique musculaire liée à l'ingestion du repas), même si celui-ci contient l'apport protéique conseillé. Ceci peut être expliqué par la mise en place d'une résistance de la synthèse des protéines musculaires à l'effet stimulateur des acides aminés/insuline issus de la digestion des protéines alimentaires. En d'autres termes, dans ces situations, il faut amener plus d'acides aminés et donc générer une aminoacidémie plus importante suite à l'absorption d'un repas (phase post-prandiale) pour créer un effet anabolique similaire à celui obtenu chez un individu dont le capital musculaire est normal et non résistant.

Jusqu'à présent, la majeure partie des études se sont focalisées sur l'apport de protéines à digestion rapide générant rapidement d'importantes aminoacidémies et à fortes teneurs en leucine (exemple : les protéines du lactosérum). Ces études ont montré que l'hyperaminoacidémie est un levier important pour restimuler la synthèse des protéines quand celle-ci devient moins sensible à la prise alimentaire et ceci quel que soit la situation physiopathologique étudiée.

Le maintien de la masse protéique musculaire ou la récupération de son capital musculaire suivant un état d'atrophie dépend donc de la capacité des acides aminés alimentaires à stimuler de façon maximale l'anabolisme protéique (hyperaminoacidémie adaptée). Un autre facteur prépondérant dans le gain de masse musculaire est la durée pendant laquelle l'anabolisme va être présent et efficace pour générer de l'accrétion protéique dans les muscles. En d'autres termes, plus la période d'accrétion protéique post-prandiale sera longue plus l'effet des protéines alimentaires sera efficace.

Dans ce projet, nous souhaitons proposer des stratégies innovantes pour palier à la résistance anabolique de l'effet repas en comparant :

- l'effet cinétique de protéines lentes (caséine) et rapides (lactosérum et protéines végétales (pois et blé),

- associées à la modification cinétique des apports énergétiques : chrononutrition séquentielle (apport en acides aminés d'abord puis d'un supplément énergétique décalé) n'a, à notre connaissance jamais été étudiée lors de situations de résistance anabolique et de fonte musculaire physiologiques ou pathologiques.

Le modèle catabolique choisi sera le traitement aux glucocorticoïdes (dexaméthasone) donné par voie orale au moment du repas.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le mini porc (n=27) afin de caractériser les effets de sources protéiques optimisées sur le maintien de la masse musculaire.

In fine, l'étude proposée permettra de fournir des résultats scientifiques sur l'intérêt potentiel de certaines sources protéiques et d'un apport énergétique décalé du repas dans le maintien et la récupération musculaire des personnes malades.

3667. Les traitements actuels de l'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) chez l'homme impliquent un remplacement de l'aorte endommagée pendant une opération chirurgicale ou bien le déploiement d'une prothèse endovasculaire. Afin de suppléer ces traitements

chirurgicaux classiques, des protocoles thérapeutiques alternatifs sont développés dans le but de stabiliser les AAA et réparer les lésions. Il s'agit principalement de thérapies cellulaires mises au point sur des modèles animaux d'AAA.

L'objectif de ce projet est d'évaluer des thérapies cellulaires à base de cellules souches ou de cellules musculaires lisses permettant de traiter les AAA obtenus par le modèle de xénogreffe chez le rat. Ce modèle, qui reproduit des caractéristiques importantes des AAA humains, consiste à greffer sur l'aorte du rat, une aorte de cobaye décellularisée. Dans cette étude, des essais mécaniques uniaxiaux seront effectués par une machine de traction sur des échantillons d'aorte abdominale de rat sains, pathologiques et traités par thérapie cellulaire. La fonctionnalité des aortes sera de plus évaluée *in vitro* en effectuant des tests de pressurisation-élongation axiale grâce à un myographe. Ces différents essais donneront accès à des mesures de propriétés mécaniques (rigidité, contrainte à la rupture) qui permettront d'évaluer les effets des thérapies cellulaires proposées. Une corrélation sera également réalisée entre les propriétés mécaniques et les changements de densité des constituants microstructuraux (élastine, collagène) de la paroi aortique préalablement analysés et quantifiés à partir de coupes histologiques.

Ce projet va permettre de mieux caractériser sur le plan mécanique les thérapies cellulaires déjà mises au point ainsi que le modèle d'anévrisme lui-même. Nous n'avons pas identifié d'inconvénients ou de risques particuliers liés à ce projet.

Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* ou *in silico* permettant de tester des thérapies cellulaires de l'AAA. Les modèles animaux sont donc essentiels et ne peuvent être remplacés.

Pour effectuer un test de pressurisation-élongation, il est nécessaire de disposer d'une aorte abdominale entière avec une longueur suffisante et une structure tubulaire qui ne fuit pas pour résister à la pression. Un rat est donc nécessaire par test. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, les tests uniaxiaux seront effectués sur les mêmes échantillons, à la suite du test de pressurisation-élongation. De plus, les aortes de cobaye prélevées sont séparées en deux et permettent de réaliser deux greffes, réduisant ainsi de moitié le nombre de cobayes nécessaires.

Nous limiterons le nombre de tests de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous estimons le nombre nécessaire d'échantillons à 10 par groupe (formule décrite plus loin dans ce document, voir section 3.3.5) : 10 aortes saines, 10 anévrysmes et 10 anévrysmes traités par thérapie. En testant deux thérapies différentes, nous estimons donc le nombre d'animaux à utiliser à hauteur de 40 rats et 15 cobayes.

Les animaux opérés bénéficieront d'un suivi quotidien après leur opération afin de repérer d'éventuels signes de douleur ou des complications. La procédure étant très bien maîtrisée aujourd'hui (mise en œuvre depuis 10 ans) de tels événements sont très rares.

3668. La recherche en aquaculture doit contribuer au développement de solutions pertinentes et efficaces, basées sur des connaissances scientifiques solides en termes de biologie de l'adaptation du poisson lorsque celui-ci est soumis à des situations de stress. Il devient alors essentiel de proposer des approches méthodologiques novatrices dans le domaine du phénotypage caractérisant l'adaptation du poisson à travers l'étude du comportement, l'endocrinologie du stress et le maintien de l'homéostasie.

Le présent projet est impliqué dans un programme européen dont l'objectif est d'associer différentes méthodologies et protocoles afin de phénotyper pour leur état de santé et leur bien-être plusieurs espèces de poissons exposés à différents stress environnementaux, et ce dans différentes infrastructures expérimentales en Europe.

L'objectif de notre projet est d'évaluer, en pisciculture expérimentale, les conséquences de stress environnementaux créés par la détérioration des caractéristiques physico-chimiques de l'eau (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>) additionnée ou non de stress aigus répétés, imprévisibles et incontrôlables (chasse à l'épuisette, flash lumineux) sur les capacités adaptatives de la truite arc-en-ciel. Ces stress sont identifiés en pisciculture et représentatifs des conditions d'élevage rencontrées classiquement. A terme ce projet nous permettra d'identifier les phénotypes de réponses au stress les plus pertinents afin de fournir des indicateurs opérationnels du bien-être des poissons en élevage.

Des truites arc-en-ciel immatures seront réparties dans 3 conditions : Témoin (bonne qualité d'eau), Stress 1 (qualité d'eau détériorée), Stress 2 (qualité d'eau détériorée associée à des stress aigus journaliers).

Les effets des différents stress seront mesurés à court (2 jours), moyen (10 jours) et long terme (3 semaines) sur la physiologie branchiale (la branchie étant le principal organe impliqué dans le maintien de l'homéostasie ionique et gazeuse de l'animal) et sur l'axe corticotrope (l'activation de cet axe étant responsable des niveaux sanguins d'une hormone de stress : le cortisol). Pour cela, des prélèvements de sang et de tissus (branchies, cerveau, hypothalamus, hypophyse, interrénale) seront réalisés une fois les animaux euthanasiés.

Des observations comportementales seront également réalisées dans chacune des trois conditions afin de caractériser les réponses phénotypiques comportementales pendant le stress environnemental. Nous évaluerons également la réactivité émotionnelle en isolement social et les capacités d'apprentissage des truites à l'issue des 3 semaines de stress.

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 1800 poissons. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément les réponses physiologiques et comportementales des poissons au stress.

- Réduire : Le nombre d'animaux est adapté au plus juste pour permettre à la fois une densité de poissons par bassin représentative des conditions d'élevage et à la fois une évaluation statistique de la variabilité individuelle (ou du groupe pour l'étude du comportement) de la réponse.

- Raffiner : Les prélèvements ne seront réalisés que sur des animaux euthanasiés et ce, dans les conditions réglementaires. Le protocole permettra de décider d'une interruption de l'expérimentation en cas de franchissement du point-limite.

3669. L'acidose ruminale subaigüe est une maladie fréquemment rencontrée dans les élevages de vaches laitières à haut niveau de production. Cette maladie se définit par une chute anormale du pH du jus de rumen en lien avec la distribution de ration riches en énergie. Elle est à l'origine d'une diminution des performances de production impactant le résultat économique mais également d'un état d'inconfort des animaux et dans les cas plus graves de nombreux problèmes physiopathologiques (boiteries, déplacements de caillette...). Etant données la variabilité de réponse des animaux à une même ration et l'absence de signes cliniques spécifiques dans les stades précoces de la pathologie, l'acidose ruminale subaigüe ne peut être diagnostiquée en élevage que par des techniques invasives (tubage ou trocardage) permettant de prélever du jus de rumen. Ces pratiques ne sont pas à recommander pour des raisons évidentes de bien-être même si elles sont utilisées dans d'autres pays. L'objectif du projet est de développer un outil non invasif de diagnostic précoce et utilisable sur le terrain en routine. Cet outil sera notamment basé sur l'analyse du profil en acides gras du lait qui peut aujourd'hui être obtenue en routine. En effet, il existe un lien entre le pH du jus de rumen, le profil en acides gras du contenu du rumen et le profil en acides gras du lait. Pour construire cet outil, il est nécessaire de disposer de données permettant d'établir les relations dans une gamme de situations alimentaires classiquement rencontrées en élevage. Les premiers résultats obtenus sont encourageants mais doivent être affinés et précisés en

diversifiant les situations alimentaires. Deux essais seront mis en place pour tester les effets de la proportion de concentré en interaction avec la teneur en acides gras polyinsaturés de la ration (premier essai) et avec l'apport de foin (second essai). Les mesures concerneront principalement les paramètres fermentaires du rumen et le profil en acides gras du lait. Ces essais seront réalisés sur vaches laitières en début et milieu de lactation car ce sont ces animaux les plus sujets à l'acidose ruminale subaiguë. Le remplacement par une autre espèce, un autre sexe ou un autre stade de lactation est donc impossible. Pour prendre en compte le bien-être animal, nous avons cherché à limiter la durée des expérimentations et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Nous avons choisi des schémas expérimentaux en split-plot utilisant 6 vaches par essai pour réduire au plus juste le nombre de périodes expérimentales tout en gardant une puissance statistique suffisante pour obtenir des résultats exploitables.

3670. La Pasteurellose est une maladie endémique des élevages cynicoles : « il n'existe pas d'élevage de lapin sans Pasteurelles ! ». Ces bactéries sont responsables de pathologies variées chez l'adulte (abcès, problèmes respiratoires, avortements) mais provoquent surtout une mortalité des lapereaux après le sevrage. La mise au point d'un modèle d'infection expérimentale permettrait de tester l'efficacité de différents moyens de prévention (résistance génétique, vaccination). L'objectif de ce projet est la mise au point d'un modèle d'infection par *Pasteurella* chez le Lapin. La littérature consacrée à cette infection étant très limitée, nous souhaitons comparer 2 voies d'inoculation (la voie nasale et la voie sous cutanée), et 25 souches de *Pasteurella* sélectionnées parmi des groupes génétiques définis au préalable par des techniques de biologie moléculaires appliquées à une collection de 171 souches isolées lors du suivi vétérinaire d'un grand nombre d'élevages en France.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, une première phase permettra de définir la voie d'inoculation la plus représentative de l'infection naturelle en utilisant 5 souches de *Pasteurella* les plus divergentes parmi les 25 sélectionnées. Le modèle d'inoculation ainsi déterminé sera appliqué aux 20 souches restantes afin de définir les ou les couples voies d'inoculation-souche de *Pasteurella* constituant le modèle expérimental d'étude de la pasteurellose chez le lapin.

L'ensemble de ce projet nécessitera l'utilisation de 150 lapins. La définition préalable d'un modèle expérimental robuste utilisant un nombre raisonné d'animaux participe au raffinement et à la réduction du nombre d'animaux expérimentaux utilisés dans un programme de sélection génétique à venir.

3671. Utilisé comme «réactif» dans les techniques d'immunofluorescence, d'immun marquage ou encore en immunohistochimie les anticorps sont généralement disponibles chez des fournisseurs commerciaux.

Cependant dans le cas de recherches sur des protéines rares ou en cours de caractérisation il n'existe pas d'anticorps commerciaux et il est nécessaire de les produire. Il faut alors immuniser des animaux pour les faire produire des anticorps contre la protéine étudiée.

Certaines espèces animales sont particulièrement employées pour produire des anticorps: le lapin, la souris, le rat, la chèvre, le mouton et le cheval. Le choix de l'animal repose sur divers critères: la quantité d'antigène disponible, les quantités d'antisérum souhaité, la facilité et le coût d'entretien des animaux.

De par sa taille intermédiaire le lapin est souvent utilisé pour la production d'anticorps polychoraux et représente l'animal le plus utilisé. Il produit des volumes suffisants d'antisérum présentant un titre élevé et une forte affinité vis à vis de l'antigène injecté.

Notre structure propose donc un service de production d'immun sérum de lapin a façon.

L'objet de cette saisine est de présenter les deux procédures d'immunisation les plus classiquement réalisées au sein de l'unité.

- Une procédure de 70 jours incluant 4 ou 5 rappels immunisation permettant la production rapide d'une quantité limitée de sérum adapté pour la production d'Ac spécifique à des projets de recherches pour une utilisation ponctuelle.

- Une procédure étalée sur 12 mois avec des immunisations et des prélèvements mensuels permettant la production d'une quantité plus importante de sérum plus affin utilisé dans la confection de kit de dose hormonaux par exemple.

La première procédure nécessite l'immunisation de deux lapins par antigène alors que pour la seconde quatre à six lapins sont nécessaires en fonction de la quantité d'antigène souhaitée.

Le nombre d'animaux utilisés sur la période est fonction des demandes mais ne dépassera pas les 100 lapins sur 5 ans.

Le nombre d'animaux utilisés et réduit au minimum afin d'assurer une production suffisante sans avoir à renouveler la procédure en cas de non réponse ou de réponse intermédiaire. Le raffinement est apporté par l'enrichissement de milieu utilisant des objets à rongé et par la procédure de prise de sang après tranquillisation des animaux pour éviter tout stress

3672. Ces travaux pratiques (TP) répondent au contenu du Programme Pédagogique National du DUT Génie Biologique et comprennent des enseignements pratiques en Physiologie et en Pharmacologie.

Les travaux pratiques réalisés par les étudiants visent à les familiariser avec les pratiques de l'expérimentation animale indispensables à leur formation de futurs techniciens de laboratoire. Ils procèdent, sur l'animal anesthésié et analgésié, à des prélèvements de liquides biologiques (sang), contenu de l'estomac, de l'intestin...), ainsi qu'à des administrations par voie veineuse de différents médicaments afin d'en visualiser les effets sur l'organisme entier (évolution de la pression artérielle, de l'absorption intestinale, de la sécrétion gastrique, de la glycémie ...). Ces manipulations permettent d'approcher et d'explorer les grandes fonctions physiologiques telles que la régulation de la pression artérielle, de la diurèse, de la sécrétion gastrique ou encore de l'absorption intestinale. Ainsi, les étudiants apprennent à exploiter des modèles d'étude in vivo développés dans les laboratoires de recherche et de développement tout en les sensibilisant à la réglementation encadrant l'expérimentation animale.

L'approche de la manipulation animale répond à une démarche progressive : enseignement des bases de la physiologie, enseignement de la réglementation encadrant l'expérimentation animale, enseignement de l'anatomie des rongeurs, dans une première étape puis observation de photos reprenant les différentes étapes pratiques des manipulations commentées pas à pas, démonstrations par les enseignants avant que les étudiants, encadrés par les enseignants et les techniciens habilités, ne commencent leurs manipulations sur des rats préalablement analgésiés. Les rats sont anesthésiés et sont euthanasiés en fin de séance selon la réglementation.

Le nombre d'animaux utilisés est de 481 rats/an soit 2405 rats/5 ans au maximum à raison de 1 rat/binôme en 1ère année et 1 rat/étudiant en 2ème année.

3673. Les cancers de la peau sont les cancers les plus fréquents et constituent un problème de santé publique majeur. Parmi ces cancers, le mélanome est le plus grave et l'un des cancers les plus agressifs du jeune adulte. Les mélanomes se développent à partir des mélanocytes, cellules situées dans la partie profonde de l'épiderme et qui fabriquent les pigments responsables de la coloration de notre peau. L'exposition récréative et intermittente au soleil, pendant l'enfance en particulier, est la principale cause environnementale de la majorité

des mélanomes. Dépisté tardivement à un stade avancé ou métastatique, il n'existe actuellement aucune stratégie thérapeutique pour traiter ce cancer résistant aux traitements conventionnels comme la chimiothérapie ou la radiothérapie. Comme tous les cancers, le mélanome se développe suite à l'accumulation d'erreurs dans la programmation de nos gènes qui conduisent les cellules à se diviser et à proliférer éternellement. Mais l'aspect le plus dangereux du mélanome est que certaines de ces cellules malignes peuvent acquérir rapidement la capacité de s'enfuir de la tumeur initiale et de disséminer pour atteindre d'autres organes et y former de nouvelles masses tumorales : c'est le processus métastatique. Notre laboratoire mène une recherche visant à mieux comprendre au niveau fondamental comment naît et se développe le mélanome et à décrypter les différentes étapes conduisant à la métastase. Le but de ces recherches est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques afin de mieux combattre ce cancer qui reste incurable dans les stades avancés et métastatiques. Dans ce contexte, nous étudions depuis plusieurs années la protéine matricielle de communication SPARC qui est produite anormalement par les cellules tumorales mélaniques. Dans des modèles cellulaires, SPARC joue un rôle dans la survie de cellules de mélanome et dans la protection aux chimiothérapies et aux nouvelles thérapies ciblées ainsi que dans leur capacité à migrer et à envahir les tissus. Ainsi, SPARC serait un acteur clé du développement tumoral des mélanomes. Nos projets visent à répondre aux nombreuses questions qui restent posées quant au rôle exact de SPARC au cours de la transformation tumorale du mélanocyte en mélanome *in vivo*. En particulier, quelle est la relation entre SPARC et le rayonnement UV ? et est-ce que sa surexpression dans les cellules normales est suffisante pour conduire à la cancérisation du mélanocyte et au développement des métastases ? Pour répondre à ces questions, nous avons développé des modèles de souris originaux permettant l'expression spécifique de SPARC dans les mélanocytes afin de mimer le phénomène observé dans les mélanomes. Nous évaluerons le développement des mélanomes et la coopération entre SPARC et les principales altérations retrouvées dans les mélanomes chez l'homme (comme la mutation oncogénique BRAFV600E et la perte du gène suppresseur de tumeur PTEN). Nos recherches permettront d'enrichir nos connaissances sur les mécanismes liés au développement métastatique du mélanome et de valider la protéine SPARC comme nouveau promoteur du mélanome. Rechercher si la protéine SPARC intervient dans la mélanomagenèse devrait donc avoir des retombées significatives en cancérologie clinique en permettant d'imaginer de nouveaux traitements visant à limiter son action pathologique. En respect de la règle des 3R visant au mieux à réduire le nombre d'animaux, prendre en compte la douleur de l'animal et utiliser des méthodes alternatives (études *in vitro* et imagerie non-invasive par bioluminescence), le nombre total de souris estimé pour ce projet est de 1500.

3674. Les expériences traumatogènes et le stress social, comme une agression, contribuent à l'apparition de troubles psychiatriques, y compris une anxiété pathologique, des états dits de stress post-traumatique, des dépressions majeures et une incapacité à établir des liens sociaux. La fréquence de ces troubles est élevée dans notre société moderne et à des conséquences désastreuses en termes économiques et sociaux. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant l'étiologie de ces troubles psychiatriques demeurent mal connus, ce qui empêche le développement de thérapies adaptées. D'un point de vue clinique, il est important de comprendre comment chaque individu contrôle ses émotions et gère des situations stressantes. Ce projet a pour but d'élucider les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent les changements comportementaux et cellulaires induits par un stress social. Pour répondre à ces questions complexes, seul le recours à un modèle animal est possible. En effet, les circuits dérégulés chez l'homme sont également présents chez le rongeur. De plus, les avancées techniques (transgénèses, utilisation de virus adéno-associés) permettent d'établir des liens de causalité entre des modifications cellulaires et des modifications comportementales. Entre autres, nos expériences utiliseront des virus adéno-associés nous permettant d'avoir une précision anatomique quant aux effets du stress en s'intéressant en particulier à une structure localisée dans le tronc cérébral. Notre projet utilise comme modèle la souris adulte (âgée de plus de 2 mois; 285 animaux au maximum par an) et dans un souci du respect de la règle des 3R, les mêmes lots d'animaux sont ré-utilisés pour les différents tests comportementaux. Nous nous intéresserons aux modifications de la neurotransmission dopaminergique. La dopamine est une molécule plus connue pour son rôle dans la maladie de Parkinson et dans les troubles addictifs, mais, plus récemment, un nombre croissant d'études semble indiquer un potentiel important de cette molécule dans les pathologies liées au stress. Les résultats expérimentaux de ces études pourront permettre d'envisager des approches thérapeutiques plus ciblées.

3675. Suite à une pollution accidentelle en mer, un suivi environnemental est systématiquement mis en place avec pour principal objectif de prévoir les conséquences de cet événement sur la santé des populations d'organismes marins et d'évaluer les risques environnementaux encourus par l'écosystème impacté. Au cours de ces dernières années, de nombreuses procédures ont été développées afin de caractériser l'impact des pollutions accidentelles sur les poissons via l'utilisation de biomarqueurs. Cependant, il est bien souvent difficile de relier les informations apportées par ces biomarqueurs à l'état de santé global des individus exposés et de déduire les conséquences à long terme de la pollution.

L'étude proposée ici vise à caractériser l'impact d'une pollution par hydrocarbure traitée aux dispersants sur l'état de santé global de mullets dorés, *Liza aurata* à l'aide d'une nouvelle méthodologie basée sur des challenges qui s'inspirent de ceux pratiqués en médecine humaine : les tests d'effort. La méthodologie suivie se décline en trois phases :

Phase 1 : caractérisation de l'état de santé initial des poissons, de manière non invasive, à l'aide de trois types de challenge (étude de leur résistance à une augmentation de la température, à une diminution de l'oxygène dissous et évaluation de leur capacité de nage).

Phase 2 : exposition des poissons à des pétroles qui, selon les conditions d'essais, seront dispersés chimiquement ou non (population contrôle, populations exposées à deux dispersants différents, populations exposées à deux pétroles différents et populations exposées à des pétroles dispersés chimiquement).

Phase 3 : évaluation de l'impact du pétrole sur la santé des poissons en procédant à deux nouvelles séries de challenges à l'identique de la phase 1. Ces deux séries de challenge auront lieu respectivement un et six mois après l'exposition aux contaminants afin d'évaluer les effets à court et moyen terme.

L'objectif étant d'évaluer si le contaminant a modifié ou non les performances physiologiques des poissons et, par voie de conséquence, aura une incidence sur leur trait de vie.

Ce projet prendra en compte la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement). En ce qui concerne la règle de remplacement, ce projet nécessite l'utilisation de poissons vivants au vu du niveau d'organisation biologique étudié (physiologie et trait de vie). Concernant la règle de réduction, ce projet nécessite un minimum de 500 animaux. En dessous de ce nombre, les résultats ne sont plus exploitables du fait de la forte variabilité interindividuelle des performances qui seront mesurées pendant les challenges. L'espèce choisie est le mullet doré *Liza aurata*, un poisson dont la biologie et la zootechnie sont bien connues et qui est fréquemment utilisé en expérimentation. Pour respecter la règle de raffinement, l'ensemble du projet se déroulera dans des locaux dédiés et isolés, dans des conditions d'élevage respectant les besoins physiologiques des poissons et en utilisant des protocoles qui auront pour objectif de répondre à la question scientifique posée tout en limitant autant que possible le mal-être des animaux.

3676. L'objectif de cette étude est d'obtenir des xénogreffes de tumeurs fraîches de patients métastatiques traités à l'hôpital Saint-Louis, avec leur accord de non opposition (cancers du sein, cancers du rein, sarcomes, cancers gynécologiques)

A partir de ces xénogreffes, une amplification du matériel tumoral est nécessaire pour :

1) Faire de la pharmacologie préclinique individuelle (tester des drogues ou combinaisons de drogues sur un modèle de xénogreffe afin de déterminer le meilleur traitement pour le patient correspondant)

2) Etudier les mécanismes de résistance aux drogues par la réalisation d'analyses histologiques, d'analyses en biologie moléculaire, et par l'étude des cellules souches tumorales.

Ces modèles de xénogreffes sont les seuls qui existent pour étudier le bénéfice de modèles animaux de tumeurs humaines en pharmacologie préclinique individuelle. Ce travail pourrait à terme améliorer la prise en charge thérapeutique des patients avec un cancer métastatique en situation de recours.

Par ailleurs, des prélèvements séquentiels par biopsie sous échographie des tumeurs traitées seront réalisés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et augmenter la puissance statistique de nos travaux, respectant ainsi la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement).

Au total, on estime devoir utiliser entre 325 et 500 animaux par an, soit 1625 à 2500 animaux pour la durée totale du projet

3677. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale.

Il est possible de prévenir ces pathologies (principalement cardiopathie coronarienne et accident vasculaire cérébral) en intervenant sur les facteurs de risques (hypertension artérielle, diabète, obésité, dyslipidémie, tabagisme...). Ces maladies cardiovasculaires et ces facteurs de risque associés peuvent être étudiés au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies. Ce projet s'inscrit dans le cadre du screening secondaire, à savoir que seuls les produits ayant une activité pharmacologique intéressante observée sur des tests *in vitro* et/ou *ex vivo* seront étudiés afin d'évaluer leur efficacité *in vivo*.

Dans le cadre de nos recherches dans le domaine cardiovasculaire, il est nécessaire de mesurer les paramètres physiologiques, tels que la pression artérielle et la fréquence cardiaque, mesures réalisables uniquement chez l'animal vivant. L'évaluation de ces paramètres hémodynamiques est indispensable à la sélection d'un nouveau candidat médicament, à la fois pour documenter son efficacité thérapeutique mais également son innocuité.

Pour ce faire, deux méthodes existent. La première, la télémetrie, est une méthode de référence permettant la mesure des paramètres hémodynamiques à distance, en temps réel, sur une période pouvant aller jusqu'à 6 mois au sein de l'animalerie, sans contrainte pour l'animal et dans son environnement habituel. Cette technique nécessite la mise en place de l'implant sous anesthésie générale pendant toute la durée de l'acte chirurgical avec réveil. Les contraintes techniques de ces implants obligent un hébergement individuel. Les données obtenues par cette technique sont fiables et reproductibles. Les animaux sont utilisés à plusieurs reprises après une période de récupération « wash-out » permettant ainsi de réduire le nombre utilisé.

La seconde technique consiste en l'implantation de cathéters en voie artérielle et veineuse afin de mesurer les paramètres hémodynamiques chez l'animal vigile dans son environnement habituel. La mise en place des cathéters est réalisée sous anesthésie générale pendant toute la durée de l'acte chirurgical. Pour une bonne récupération post-opératoire, les animaux sont placés en hébergement individuel. Les animaux peuvent être réutilisés une fois, en respectant une période de récupération entre chaque administration, contribuant aussi à une utilisation d'animaux diminuée. Un enrichissement du milieu est apporté à tous les animaux en hébergement, quelle que soit la technique dans laquelle ils sont ou doivent être inclus, sous la forme de bâtonnets de bois à ronger. Cet apport permet en particulier de limiter les contraintes liées aux hébergements individuels imposés par ces techniques.

Le choix de ces deux techniques ainsi que l'enrichissement de milieu associé contribuent donc au raffinement et à la réduction, composantes de la règle des 3R.

Ce projet nous permet d'évaluer les effets hémodynamiques de produits pharmacologiques en phase aiguë et/ou chronique et ainsi obtenir des informations sur la tolérance et sur la cinétique des effets hémodynamiques. La durée du traitement oriente principalement le choix de la méthode expérimentale. En effet, dans le cas d'un traitement chronique, la télémetrie est favorisée. En revanche, dans le cadre de produits à tester en phase aiguë, la chirurgie plus légère nécessaire à l'implantation des cathéters est privilégiée.

Le rat est un modèle expérimental pertinent pour la mesure des différents paramètres hémodynamiques *in vivo*. De plus, des souches mutantes présentant une hypertension artérielle existent. La taille de cet animal permet également de réaliser différents prélèvements en quantité suffisante pour les évaluations *ex vivo*.

Nous travaillons avec des animaux au développement mature car l'objet du projet est de travailler avec des rats adultes jeunes (à partir de 10 semaines) et des rats adultes vieux (à partir de 50 semaines) pour étudier l'effet de l'âge sur le système cardiovasculaire. Un âge de maintien maximum de 65 semaines a été déterminé afin de limiter le risque d'accidents vasculaires cérébraux et la survenue de signes de détérioration de l'état général.

Les données de la littérature chez les rongeurs indiquent une utilisation de 6-9 animaux par groupe : 'contrôle', 'traité' pour étudier les effets hémodynamiques d'un composé.

Nous estimons une utilisation de 300 rats par an pour la télémetrie et d'environ 250 rats implantés de cathéters. Ainsi, sur la durée du projet évaluée à 5 ans, environ 2750 animaux seront nécessaires

3678. La myasthénie grave est une maladie auto-immune rare. Elle est liée à la production d'auto-anticorps dirigés essentiellement contre le récepteur à l'acétylcholine (RACH), situé à la jonction neuromusculaire. Ces auto-anticorps altèrent la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle conduisant à des faiblesses musculaires plus ou moins invalidantes. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour la myasthénie. Les traitements actuels proposés aux patients sont essentiellement symptomatiques ou non-spécifiques, et doivent être pris à vie.

Si le muscle est l'organe cible dans la myasthénie, l'organe effecteur dans la myasthénie est le thymus. En effet, le thymus des patients présente très souvent de nombreux centres germinatifs ectopiques (thymus hyperplasique). Il présente aussi tous les acteurs nécessaires à une réaction immunitaire contre le RACH. En effet, les différentes sous-unités du RACH sont directement exprimées dans le thymus. De plus, des cellules T auto-réactives pour le RACH sont détectées dans le thymus et les lymphocytes B des centres germinatifs produisent des anticorps contre le RACH.

La myasthénie peut être induite chez la souris ou le rat en les immunisant en présence d'adjuvant complet de Freund avec le RACH extrait de l'organe électrique de poisson torpille. Ces animaux produisent alors des auto-anticorps induisant une perte du RACH sur le muscle au niveau des plaques motrices et un dysfonctionnement de la transmission neuromusculaire. Ce modèle permet d'étudier l'action des auto-anticorps au niveau du muscle. Cependant, dans la myasthénie induite, on n'observe jamais d'hyperplasie thymique.

Etant donné le rôle central du thymus dans le développement de la myasthénie humaine, ce projet de recherche a pour objectif de mettre au point un nouveau modèle animal de la myasthénie avec hyperplasie thymique.

Ce projet implique l'utilisation de souris; environ 288 souris C57bl/6, 144 souris transgéniques K5-CXCL13 et 144 souris invalidées pour miR-29a. Toute la démarche scientifique a été établie afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et obtenir des résultats statistiquement relevant en utilisant le moins de souris possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris.

A long terme, ces travaux permettront de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'émergence de la myasthénie et de rechercher de nouveaux traitements.

3679. Notre approche vise à stimuler ponctuellement le taux de cellules progénitrices mésenchymateuses endogènes circulantes afin d'augmenter leur biodisponibilité sur le site de néo-ostéogenèse. Ceci peut être obtenu par l'utilisation de facteurs de croissance mobilisant ce contingent cellulaire de la moelle et le libérant dans la circulation sanguine. Nous attendons de cette contribution quantitative, une stimulation de la consolidation des fractures, et des processus de régénération des tissus squelettique de manière plus générale.

Nous suggérons l'emploi de facteurs de croissance tels que le G-CSF. Ce facteur de croissance stimule également la différenciation médullaire puis la libération sanguine des cellules souches vasculaires impliquées dans l'angiogenèse et la vasculogenèse.

Le protocole expérimental sera mené sur 45 rats Sprague Dawley, mâles, âgés de 10 à 12 semaines.

Le projet consiste à développer et exploiter un modèle expérimental de réparation de fracture chez le rat dans le but :

- d'étudier les mécanismes biologiques par lesquels les contraintes mécaniques régulent la formation de l'os au niveau du cal osseux ;
- d'élaborer un modèle permettant d'établir une loi d'évolution entre l'os sain et le cal osseux à partir de la caractérisation de leurs morphologies (imagerie), de leurs propriétés mécaniques, de leurs natures moléculaires et de leurs structures tissulaires.

Ce projet va nous permettre de déterminer les caractéristiques biomécaniques du cal osseux chez l'animal au cours de la réparation et d'apporter de nouveaux éléments de compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'évolution et la nature du cal osseux.

La règle des 3 R est respectée. En effet, il n'existe pas de méthodes alternatives. L'objet de cette étude est la compréhension du processus de réparation de la fracture et l'identification des paramètres qui influencent ce processus à l'échelle macroscopique. Ces objectifs nécessitent d'imposer des contraintes mécaniques subies par le cal osseux à l'échelle de l'organe. Ces contraintes mécaniques et leurs effets sur l'os ne peuvent pas être reproduits dans des modèles in vitro mais seulement in vivo chez l'animal. Le nombre d'animaux est réduit au minimum pour pouvoir réaliser des statistiques. En cas de pathologies (ex. infection cutanée, fièvre) ou perturbation du comportement (douleur) de l'animal, un traitement adapté sera prescrit. Le protocole sera interrompu et le rat euthanasié dans les cas suivants :

- Perte de 20% ou plus de son poids mesuré 2 jours après l'opération.
- Fracture détectée par radiographie

Pour le suivi radio, les rats sont anesthésiés avec Médétomidine (Médétor). 0,25mg/kg. IP. Juste après la radio, ils sont réveillés avec de l'Atipemazole (Revertor). 200µg/kg. Injecté en sous-cutanée

- Infection cutanée incurable

La procédure de gestion des rats lorsqu'une pathologie se déclare sur l'animal opéré ou tout autre animal hébergé dans l'animalerie est l'évaluation par le Vétérinaire Responsable de l'animalerie, en informant le chercheur et en décidant ensuite du traitement ou pas de l'animal ou de son euthanasie.

3680. Afin qu'un nouveau composé chimique devienne un médicament sûr et efficace un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Certaines classes de molécules sont par ailleurs susceptibles d'entraîner des troubles cardiovasculaires, tels que des arythmies, des troubles de la contractilité, ou encore des atteintes valvulaires. Il est donc indispensable de mettre en place des protocoles permettant de s'assurer de l'absence de tels effets avant d'administrer le composé chez l'Homme. Ce type d'évaluation approfondie du fonctionnement cardiaque ne peut être conduit actuellement en dehors d'expérience utilisant des animaux. L'imagerie échographique est un outil de choix pour l'évaluation non invasive de la morphologie et de la fonction cardiaque. L'objectif de la présente étude est d'évaluer chez le rat adulte, par imagerie échographique, l'effet d'un nouveau composé sur la fonction cardiaque. Ce composé a par ailleurs démontré son activité in vitro et in vivo pour le traitement d'une maladie humaine. Préalablement à l'étude principale, une étude pilote sera menée pour valider l'incidence et la fiabilité des mesures échographiques. Les animaux seront hébergés en cages avec enrichissement du milieu de vie. Le protocole d'imagerie mis en œuvre, réalisé sous anesthésie, n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse aux animaux. Il permettra de réaliser un suivi au cours du temps des mêmes animaux, réduisant par là même le nombre d'animaux nécessaire à l'étude. Une molécule de référence sera incluse dans l'étude pour valider l'expérience. Au total, 75 animaux seront inclus dans ce protocole

3681. La première partie du projet consiste en l'étude des leucémies aiguë promyélocytaire (LAP) et aiguë T de l'adulte (LAT). Nous cherchons à comprendre aussi bien les éléments à l'origine de la transformation de la cellule en cellule cancéreuse que les bases moléculaires de la réponse au traitement (pharmacologie). Les études préalablement menées in vitro nous ont fourni des pistes sérieuses pour mieux comprendre le développement de la maladie et les mécanismes mis en jeu lors de la réponse aux différents traitements. Il pourrait de plus être envisagé d'utiliser de nouvelles molécules pour le traitement de ces cancers. Des études in vivo sont à ce stade devenues indispensables pour appréhender la réaction d'un organisme entier à ces molécules et pour éprouver nos hypothèses en situation physiologique, en se rapprochant de celle retrouvée chez le patient. Les animaux utilisés seront des souris qui seront rendues malades par greffe de cellules leucémiques de moelle osseuse puis traitées ou non par différents agents thérapeutiques. Pour cela, une cohorte d'un nombre minimal de souris sera nécessaire par expérience pour obtenir des résultats significatifs. Ce nombre peut être restreint au minimum grâce aux méthodes à notre disposition qui permettent un suivi précis de la cinétique de développement de la leucémie chez l'animal. L'augmentation de la taille de la rate par palpation, signe de la progression de la leucémie, peut s'évaluer facilement. Nous disposons également à l'animalerie d'un appareil d'imagerie in vivo non invasif qui, sous faible anesthésie, permet grâce à un marquage des cellules leucémiques, de suivre la multiplication de celles-ci au cours du temps. Ainsi nous pouvons aisément savoir à quel moment débiter les

traitements et suivre le développement de la maladie afin d'euthanasier les animaux avant toute souffrance. Le nombre total d'animaux prévu pour mener à bien ces projets est de 11500 sur 5 ans.

Les résultats obtenus jusqu'à présent laissent à penser que la protéine PML joue un rôle dans la réponse au traitement de la LAP, entre autres via sa sensibilité au stress oxydant. Ainsi, dans une seconde partie du projet, nous nous attacherons à caractériser ce rôle en étudiant la fonction du gène *pml* au moyen d'un modèle murin dans lequel *pml* est inactivé. Dans ce volet du projet, les animaux ne présentent aucun signe clinique dommageable, mais un suivi quotidien sera néanmoins réalisé pour détecter toute anomalie physique et/ou comportementale révélant une douleur et/ou une souffrance. Ces animaux seront alors euthanasiés selon la procédure réglementaire.

3682. L'objectif de ce projet est de caractériser les altérations de la contraction du cœur et du diaphragme chez les sujets obèses et diabétiques et les mécanismes sous-jacents de celles-ci. Cette étude est motivée par l'observation d'une croissance épidémique de l'obésité et du diabète, lesquels impactent la pratique de l'anesthésie-réanimation à plusieurs niveaux :

- L'obésité et le diabète sont des facteurs de risque cardiovasculaires et sont source de pathologies cardiaques et respiratoires susceptibles de conduire les patients en réanimation.

- Le nombre de chirurgies réalisées chez les obèses et les diabétiques augmente. La présence d'un diabète et/ou d'une obésité augmente le risque anesthésique.

Nous cherchons donc à 1) identifier les spécificités physiopathologiques des sujets obèses et diabétiques, 2) comprendre les mécanismes de ces spécificités 3) identifier de nouvelles cibles pharmacologiques dans la prise en charge des dysfonctions cardiaques et respiratoires des patients diabétiques et obèses.

Les modèles utilisés sont des rats obèses et/ou diabétiques par sélection génétique (souche Zucker) ou par injection d'un médicament (streptozotocine) et sont reconnus comme de bons outils d'analyse de ces problématiques, proches des pathologies humaines.

Toutes les expérimentations (échographie cardiaque, hémodynamique invasive, études *in vitro*) seront réalisées sur des animaux anesthésiés

Notre équipe cible en particulier la réponse à la stimulation  $\beta$ -adrénergique, laquelle permet d'améliorer les performances contractiles en situation d'urgence ou de stress physiologique. Le nombre total d'animaux prévu est de 600 rats pour cette première phase. Les mesures suivantes sont prévues pour appliquer la règle des trois R :

1- Le nombre d'animaux sera réduit au maximum par la planification de plusieurs expérimentations séquentielles et l'étude des problématiques cœur et diaphragme en parallèle.

2- La contractilité musculaire *ex vivo* sera évaluée sur les 2 muscles papillaires du cœur et sur 2 bandes de diaphragme pour réduire le nombre d'animaux.

3- Nous réaliserons des analyses sur cellules isolées ce qui permettra des tests pharmacologiques préliminaires avec plusieurs concentrations et agents à partir d'un même animal.

4- Les tissus et le sang des animaux seront prélevés et congelés en vue d'études futures.

En fonction des résultats de cette première phase, nous prévoyons d'analyser l'effet de l'atorvastatine sur la contraction musculaire du cœur et du diaphragme. Ce médicament est fréquemment donné aux patients diabétiques et obèses, or certaines données expérimentales suggèrent que les statines ont un impact sur la contractilité musculaire. Les expérimentations seront sélectionnées avec soin pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Par ailleurs, les animaux seront élevés au sein du centre d'expérimentation fonctionnelle de l'université Pierre et Marie Curie ou ils bénéficieront d'une attention quotidienne et d'un enrichissement du milieu à l'aide de dispositifs tels que des tunnels de carton, des briquettes à ronger et des refuges.

Des points limites sont définis et vérifiés régulièrement pour interrompre l'expérimentation en cas de signe de détresse de l'animal poils hérissés, agressivité, immobilité, prostration dans un coin de la cage, absence de défécation, déshydratation, perte de poids, fréquence respiratoire accélérée, essoufflement, atrophie musculaire, yeux larmoyants et exorbités.

Enfin, les procédures sont organisées pour que chaque animal apporte un maximum d'information, par exemple la planification des évaluations *in vivo* puis *in vitro* chaque fois que possible.

3683. Tous les ans, parmi les patients – environ 500 millions dans le monde - qui souffrent de paludisme clinique, encore un million de patients -surtout des enfants- décèdent de complications. La situation est d'autant plus préoccupante que depuis plusieurs années, les parasites (tout comme les anophèles qui transmettent *Plasmodium*, le parasite agent causal du paludisme) développent de plus en plus de résistance à un nombre limité de médicaments et d'insecticides disponibles. En outre, aucun vaccin n'étant disponible pour prévenir les accès palustres et leurs complications, il est bio-médicalement et scientifiquement justifié d'identifier de nouvelles molécules ciblant la phase de développement intra-érythrocytaire asexuée de *Plasmodium*, celle qui se manifeste par les accès palustres simples ou compliqués.

Nous avons identifié deux composés, un peptide anti-microbien d'origine humaine et une nouvelle molécule d'origine végétale qui présentent des propriétés antipaludéennes *in vitro*. Il est maintenant nécessaire de tester les propriétés de ces molécules dans un modèle animal de paludisme afin d'établir leur efficacité dans un organisme entier. Nous disposons pour cela d'un modèle d'infection par deux espèces plasmodiales de rongeur. Ces infections se traduisent par une parasitémie qui se développe en quelques jours. La comparaison de la parasitémie en présence ou en absence de traitement par les molécules à tester permet d'évaluer leur efficacité.

Au total, ce projet comportera l'utilisation de 126 souris, dans deux procédures de gravité modérée. Ce nombre a été calculé au plus juste en tenant compte de la variabilité intrinsèque aux infections parasitaires *in vivo* dont nous avons une longue expérience. Des tests statistiques appropriés seront utilisés pour exploiter au mieux les résultats. L'évolution de l'infection chez les animaux sera suivie par la mesure de la parasitémie et un examen clinique quotidien des animaux afin de détecter la survenue des points limites qui ont été définis.

Ce projet permettra non seulement de tester l'efficacité de ces nouvelles molécules mais également d'étudier les mécanismes mis en jeu.

3684. L'entérovirus 71 (EV71) est un virus strictement humain appartenant au genre des *Enterovirus*. Ce virus est actuellement considéré comme un virus émergent et cause, plus particulièrement chez les jeunes enfants, un syndrome mains-pieds-bouche (HFMD en anglais), caractérisé par l'apparition de lésions cutanées maculo-papuleuses et d'ulcérations muqueuses principalement sur ces sites. Cette maladie bénigne peut s'accompagner d'encéphalite parfois associée à un œdème pulmonaire souvent mortel. Ce virus, qui depuis environ 15 ans, est surtout présent dans divers pays d'Asie du Sud-Est, a émergé au Cambodge en avril 2012 où il a provoqué une épidémie avec une morbi-mortalité pédiatrique élevée.

À l'été 2012, un consortium de chercheurs s'est constitué afin de mener des recherches pour caractériser les isolats d'EV71 circulant au Cambodge et tenter d'expliquer leur pathogénicité.

Afin d'évaluer la virulence des isolats d'EV71 responsables d'encéphalite mortelle, nous avons identifié des lignées de souris sensibles à l'infection par ce virus. Nous avons montré que certains isolats associés à des encéphalites mortelles ont une virulence accrue, et révélé le rôle d'un facteur immunitaire dans la sensibilité à l'infection des jeunes souris.

Notre étude a pour but d'identifier les facteurs viraux de la virulence de l'EV71, ainsi que les facteurs de l'hôte jouant un rôle majeur dans la virulence de ce virus en utilisant la souris comme modèle animal. Ce modèle ne peut pas être remplacé par un modèle *in vitro* car il n'existe pas de système *in vitro* permettant d'étudier le rôle des acteurs immuns dans l'infection sévère, c'est-à-dire l'infection du système nerveux central et leur conséquence sur l'organisme, ni de révéler une différence de virulence entre les isolats. Les espèces de souris utilisées seront des souris présentant un déficit immunitaire (souris Rag2<sup>-/-</sup> et Interféron gamma knock-out, IFN $\gamma$  K/O) ou non (C57BL/6). L'infection de ces animaux par voie intra-péritonéale avec l'EV71 peut provoquer une maladie caractérisée par l'apparition d'un déficit moteur atteignant partiellement un ou plusieurs membres et se manifestant par une perte partielle des capacités motrices d'une partie du corps (appelée parésies) qui évoluent très fréquemment en paralysies pouvant être mortelles et qui témoignent d'une infection du système nerveux central. L'apparition des parésies est donc un critère de virulence pour un isolat et un critère de sensibilité pour une lignée de souris.

Ce projet se déroulera sur 5 ans et devrait requérir au maximum environ 1250 animaux au total, sachant que, pour chaque expérience, un nombre minimum d'animaux permettant de réaliser des tests statistiques valides sera utilisé. Les animaux seront observés quotidiennement et le jour de l'apparition des premiers signes cliniques, parésies d'un ou plusieurs membres, sera noté puis l'animal sera sacrifié immédiatement afin d'éviter la souffrance provoquée par les paralysies qui surviennent très fréquemment dans les jours qui suivent les parésies.

L'identification des facteurs, du virus et de l'hôte, impliqués dans la virulence de l'EV71 permettra de comprendre les bases moléculaires de la pathogénicité de ce virus émergent, étape indispensable pour le développement d'une prophylaxie

3685. Les muscles squelettiques sont essentiels pour le maintien de la posture, la mise en mouvement du squelette, la respiration, la régulation du métabolisme. Le corps humain comprend plus de 600 muscles squelettiques dont la taille varie selon leur fonction. Les muscles striés squelettiques constituent le plus grand organe du corps humain (environ 40% à 50% de la masse corporelle d'un individu sain) et il est le plus grand consommateur d'éléments nutritifs. L'état du tissu musculaire est un facteur crucial dans les maladies cardiovasculaires, le cancer avec la cachexie cancéreuse, le diabète, l'obésité ainsi que l'ensemble des myopathies. La fonction du muscle squelettique est également l'un des facteurs qui limitent la durée de vie, et il joue un rôle central dans le vieillissement.

Notre équipe s'intéresse en particulier aux cellules précurseurs de muscle appelées cellules satellites. Ces cellules sont généralement quiescentes, mais lors d'une lésion musculaire, ces cellules sont capables de proliférer, puis de se différencier en cellules musculaires. Certaines cellules restent indifférenciées et reconstituent ainsi le stock de cellules satellites.

## 2- Retombées attendues

Ce projet vise à mieux comprendre le fonctionnement normal des cellules satellites musculaires et les « défauts » moléculaires qu'elles présentent lorsqu'elles ne peuvent assurer la régénération des fibres musculaires après une blessure ou l'exercice.

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

Plusieurs alternatives à l'expérimentation animale dont la culture cellulaire de cellules satellites ont été utilisées pour étudier la régénération du muscle. Cependant, la difficulté de la culture *in vitro* de ces cellules primaires et la complexité des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de la régénération des fibres musculaires requiert l'utilisation d'un modèle animal.

Au cours du dernier siècle, le modèle souris s'est développé et il est désormais un modèle de choix dans la recherche génétique sur les mammifères. Le choix du modèle de la souris est dû aux étroites similitudes génétiques et physiologiques avec les humains, et à la facilité avec laquelle son génome peut être manipulé et analysé. La souris se révèle être un système modèle idéal pour étudier le rôle de nos gènes d'intérêt sur le plan physiologique et moléculaire.

## 4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Sur une période de 5 ans, nous prévoyons l'utilisation d'environ 180 souris. Les expériences sont organisées sur des groupes de 6 animaux pour permettre une interprétation statistique fiable des résultats.

3686. Malgré l'accroissement du nombre de médicaments actifs et l'avènement des thérapies ciblées en oncologie, les progrès thérapeutiques restent encore modestes pour de nombreux types de tumeurs solides. L'un des obstacles majeurs réside en effet dans l'absence de délivrance spécifique dans les tissus tumoraux. De plus, la majorité de ces substances thérapeutiques provoque des effets indésirables sur les tissus sains. Par ailleurs, la présence de barrières biologiques (e.g. barrière endothéliale) limitent le passage des molécules potentiellement thérapeutiques du sang vers le tissu cible, restreignant leur efficacité thérapeutique. L'acheminement spécifique et précis de molécules thérapeutiques vers le tissu pathologique continue à constituer un défi majeur pour le traitement des pathologies néoplasiques. Le projet a pour objectif de valider une approche originale pour délivrer dans les tissus tumoraux et de façon précise un biomédicament : le cetuximab. Cette technologie est basée sur la combinaison des ultrasons et des microbulles homologuées en clinique en tant qu'agents de contraste pour le diagnostic. Dans ce projet, nous allons valider cette stratégie sur un modèle du cancer colorectal présentant une pertinence clinique importante avec un schéma thérapeutique incluant un biomédicament.

Une étude préliminaire chez la souris a été lancée pour permettre d'obtenir des premiers résultats expérimentaux, notamment sur la viabilité de la lignée de cellules cancéreuse utilisée, ainsi que les caractéristiques de la croissance tumorale (une saisine a déjà été déposée pour cette étude préliminaire). Dans le but de continuer à améliorer la stratégie thérapeutique, des expérimentations supplémentaires doivent être réalisées comme l'étude de la pharmacocinétique du Cetuximab, ainsi que l'effet de la répétition d'utilisation des ultrasons et des microbulles, et enfin l'association du cetuximab avec un autre traitement anti-cancéreux « classique », l'irinotécan. L'ensemble de ces tâches nécessite 152 souris. Le but est de se diriger vers l'utilisation clinique grâce à ces validations supplémentaires afin de permettre des essais cliniques dans le futur proche. La finalité du projet est d'atteindre une meilleure efficacité thérapeutique tout en réduisant les doses de l'anti-cancéreux injectées chez le patient afin de diminuer sa toxicité.

La planification des expérimentations a été réalisée selon la règle des « 3R ». Réduire : le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats interprétables a été calculé à partir de nos précédents résultats obtenus lors de d'expérimentations préliminaires. Raffiner : la présence d'une tumeur en sous-cutané localisée sur le flanc n'étant pas douloureuse pour l'animal, seules les acquisitions d'images par bioluminescence ou par échographie seront menées sous anesthésie générale car elles nécessitent que l'animal soit immobile. Remplacer : les modèles *in vitro* utilisés en parallèle ne permettent pas de modéliser la complexité de la maladie. Le modèle murin de développement de

tumeurs colorectale en sous cutané nous permettra de mimer les symptômes observés chez l'homme. Et de réaliser la preuve de concept de l'efficacité de la sonoporation pour l'amélioration de la délivrance et de l'efficacité du cetuximab dans le cancer colorectal.

3687. Les procédures décrites dans ce projet correspondent à des techniques de chirurgie d'exérèse, c'est-à-dire d'ablation partielle ou complète d'un tissu ou d'un organe. L'objectif de ce projet est d'étudier l'influence d'un tissu ou d'un organe sur la physiologie de l'animal sain ou dans le cadre d'une pathologie. Le projet a également comme objectif d'induire des modèles pathologiques (exemple : la néphrectomie 5/6ème). Enfin, ce projet permettra de tester l'efficacité et/ou l'innocuité de médicaments dans des conditions physiopathologiques similaires à celles des patients concernés par l'indication thérapeutique.

L'ensemble des procédures va être réalisé chez des rats, des souris et des cobayes. En effet, ce sont les espèces pour lesquelles les chirurgies d'exérèse sont les plus décrites/pratiquées. L'ovariectomie pourra également être réalisée chez le chien et le lapin, car ce modèle est également décrit chez ces espèces. Le choix de l'espèce va dépendre des études précliniques précédemment réalisées et du modèle à créer. La création de modèles dans ce projet ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives car la chirurgie d'exérèse s'accompagne de changements métaboliques et/ou humoraux qui auront des conséquences physiologiques ne pouvant pas être reproduites in vitro.

Le nombre d'animaux utilisés pour chaque type de chirurgie est optimisé de façon à obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant les caractéristiques physiopathologiques liées à l'ablation du tissu ou de l'organe concerné. Nous considérons que 15 animaux par sexe et par groupe pour les rats, souris, cobayes, ou 6 animaux par groupe pour les chiens et lapins, sont nécessaires pour atteindre l'objectif du modèle. Par ailleurs, les études pour lesquelles ces animaux sont destinés comporteront généralement 6 groupes : un groupe sham-operated, un groupe contrôle, un groupe référence et 3 doses de candidats médicamenteux à tester. Nous estimons à 5 le nombre de candidats médicamenteux testés par modèle et par an. Nous prévoyons donc d'utiliser sur 5 ans un maximum de 60750 rats ou souris, 13500 cobayes, 900 chiens ou lapins.

Enfin, le raffinement dans ce projet passe par l'utilisation, à minima, d'antalgique, permettant ainsi de réduire la douleur chez les animaux (pour les procédures autres que la création de modèles de douleur).

3688. Les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose sont connues pour augmenter la mortalité et la morbidité de la population en France et dans le monde. Toutefois, les changements physiopathologiques précoces associés à l'athérosclérose sont mal connus. L'objectif du projet est de conduire des analyses de protéomique et transcriptomique des tissus vasculaires pour identifier les facteurs de risques tels que l'hypertension, le diabète, l'hypercholestérolémie, connus pour conduire au développement de l'athérosclérose chez l'homme. En accord avec la littérature nous utiliserons des modèles murins appropriés, soit 100 souris sur la durée du projet (20 souris C57BL/6J +, 40 souris apoE-/- +, 40 souris LDLR-/-). L'espèce utilisée permet de réduire au maximum le nombre d'animaux pour atteindre les objectifs du projet. Dans le but de respecter la règle des 3R, les procédures utilisées sont optimisées de façon à limiter au maximum la douleur et le stress ainsi un (anesthésie post-opératoire, suivi attentif des animaux est effectué tout au long des différentes procédures.).

Nous sommes particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

**Remplacement** : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux est indispensable car l'athérosclérose est impossible à reproduire sur des modèles in vitro simplifiés. Les études sont systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire (doses injectées, durée du traitement). De plus les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (injection intrapéritonéale).

**Réduction** : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, les expériences sont planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter de programmer des séries inutiles. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (mode et volume d'injection, durée du traitement...). Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons est extrait de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

**Raffinement** : l'application de la politique de réduction mise en place permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animal un maximum d'information. De plus la formation des personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir dans des conditions appropriées (temps de formation respecté) permet de réaliser nos expérimentations animales dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie agréé par le ministère dans un environnement enrichi (ajout de papier essuie tout pour la nidification).

3689. L'obstruction urétérale unilatérale (OUU) est un modèle expérimental couramment utilisé pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les lésions rénales responsables de la progression vers l'insuffisance rénale chronique. Ce modèle permet également des études pharmacologiques précliniques visant à tester de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir, freiner, voire stopper, l'insuffisance rénale chronique. En accord avec la littérature nous utiliserons des modèles murins appropriés soit 450 souris C57Bl6/J et 150 rats Sprague Dawley, sur la durée du projet.

Nous sommes particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

**Remplacement** : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux est indispensable car l'obstruction rénale est impossible à reproduire sur des modèles in vitro simplifiés. Les études sont systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire (micro-chirurgie, doses injectées, durée du traitement). De plus les traitements sont administrés de la façon la moins invasive possible (injection intrapéritonéale ou gavage).

**Réduction** : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, les expériences sont planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter de programmer des séries inutiles. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (micro-chirurgie, mode et volume d'injection, durée du traitement...). Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons est extrait de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

**Raffinement** : l'application de la politique de réduction mise en place permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animal un maximum d'information. De plus la formation des personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir dans des conditions appropriées (temps de formation respecté) permet de réaliser nos expérimentations animales dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont

hébergés dans un service de zootechnie agréé par le ministère dans un environnement enrichi (ajout de papier essuie tout pour la nidification).

3690. Comprendre les origines du langage est un défi en sciences humaines et en biologie évolutive. Si le langage est un attribut humain, une de ses composantes - l'apprentissage vocal - est partagée avec d'autres espèces, dont les oiseaux chanteurs (oscines). Chez le Diamant Mandarin (*Taeniopygia guttata*), les mâles apprennent à chanter pendant une période sensible de la vie précoce (comprise entre 25 et 90 jours après l'éclosion), en imitant principalement le père. Dans des conditions normales, chaque mâle produit un chant différent (durée : 1-1.5 sec). Au cours d'une expérience précédente, nous avons sélectionné des oiseaux qui ont réussi à produire une copie fidèle d'un modèle de chant diffusé par haut-parleur. Nous allons utiliser ces mâles comme fondateurs d'une colonie afin de répondre aux questions suivantes : comment le chant va-t-il évoluer dans une colonie où tous les mâles chantent le même chant? La progéniture va-t-elle aussi produire le même chant ou les jeunes mâles vont-ils inventer / improviser de nouveaux chants pour faciliter l'individualité?

Cernant les mâles nés au sein de cette colonie, nous allons enregistrer leur chant adulte. Nous allons également mesurer différents aspects de leur personnalité en conditions contrôlées et tester leur capacité à résoudre une tâche cognitive.

Chez les mâles et les femelles, nous allons mesurer la réponse vocale à la diffusion de différents types de chant afin de vérifier une éventuelle préférence pour le chant prototypique de la colonie.

Chez les mâles et les femelles, nous allons étudier les mécanismes perceptuels de la reconnaissance vocale individuelle à l'aide d'une expérience de conditionnement opérant.

Des prélèvements sanguins permettront de mesurer les taux d'hormones sexuelles (femelles) et une recherche de pedigree (deux sexes).

Mesures prises pour le respect de la règle des 3Rs :

Replace : étudier l'évolution culturelle des vocalisations dans les conditions contrôlées de laboratoire n'est pas possible d'un point de vue éthique chez l'humain. Le Diamant Mandarin est considéré comme la «souris volante» de la recherche sur le chant des oiseaux. Ce petit animal domestique est facile à élever en captivité. Aucune autre espèce animale capable d'apprentissage vocal ne se prête mieux à ce type d'étude.

Reduce: nous pensons produire près de 180 oiseaux pendant les 36 mois du projet. Cet effectif garantit une analyse statistique fiable des résultats obtenus.

Refine : différentes mesures seront prises pour réduire l'inconfort, la douleur, la peur, le stress et la souffrance au cours de nos expériences. Pour certaines expériences, les oiseaux seront privés temporairement de nourriture ou devront travailler pour obtenir une récompense alimentaire. A la fin de chaque journée pour ces expériences, les oiseaux pourront avoir accès à la nourriture ad libitum jusqu'à l'extinction de la lumière. Pour chaque expérience où les oiseaux doivent être isolés socialement, un miroir sera placé dans la cage ce qui permet de réduire significativement le stress. Au cours de ces expériences, une caméra installée dans chaque caisson expérimental permettra également un contrôle visuel de l'animal et du bon déroulement de l'expérience sans avoir besoin d'ouvrir la cage.

3691. Affiliées au système immunitaire, les cellules microgliales sont présentes dans le système nerveux central (SNC) dès les phases précoces de son développement. Les données actuelles indiquent que les propriétés fonctionnelles de la microglie sont significativement modifiées lors de nombreuses pathologies touchant le SNC immature. Elles font de la microglie une cible thérapeutique potentielle d'intérêt majeur. Pour comprendre l'impact des modifications pathologiques de la microglie, il est nécessaire de connaître les fonctions normales de ces cellules. Cette connaissance est également requise pour notre compréhension des mécanismes fondamentaux assurant la formation du SNC mature. L'objectif de ce projet est de préciser le rôle de la microglie et de gènes exprimés par ces cellules, dans le développement de populations cellulaires qui régulent l'activité des réseaux neuronaux au sein du cortex cérébral. Le projet nécessite des techniques de manipulation sélective des cellules microgliales ou de leurs gènes au sein du SNC immature, ce qui implique le recours à des animaux. L'expérimentation portera sur un total 856 souriceaux normaux (non transgéniques) et de 52 souriceaux d'une lignée transgénique préétablie et qui permet la visualisation d'une sous-population de cellules cérébrales régulant l'activité des réseaux neuronaux. Ces nombres correspondent à des valeurs minimales compatibles avec la détermination fiable de nouvelles fonctions microgliales et de l'activité de 8 gènes exprimés par la microglie. Les dispositions expérimentales et le suivi des animaux sont conçus pour éviter toute douleur ou angoisse prolongée des souriceaux qui ne seront séparés de leur mère que pendant une période très brève.

3692. La protéine membranaire SLC5A8 identifiée au laboratoire possède une fonction de senseur d'anions oxydés. Il a été montré que ce senseur est fortement exprimé au niveau de la membrane des axones. Selon les hypothèses de notre laboratoire, cette protéine contrôlerait l'utilisation du lactate par les axones. Ce senseur limiterait ainsi le stress oxydatif associé à l'utilisation du lactate versus celle du glucose. Or il a été établi que des augmentations du stress oxydatif sont globalement associées à la plupart des maladies neurodégénératives. De plus, il a été montré que l'expression du senseur était facilement perdue avec l'âge via des mécanismes de méthylation de son gène codant.

Ces mécanismes pourraient donc être importants dans les pathologies neurodégénératives associées au vieillissement. Notre équipe a élaboré des souris invalidées pour le gène codant ce senseur. Elle a pu observer que ces souris présentent en vieillissant une forte neurodégénérescence de la substance blanche (aspect spongiforme). L'objectif majeur de notre projet est de définir le rôle physiologique de la protéine SLC5A8 dans les axones et son implication dans la neurodégénérescence. Par ailleurs, SLC5A8 est également exprimée dans d'autres tissus (thyroïde, reins, glande salivaire, estomac). Nous profiterons donc de cette étude principalement dirigée sur le cerveau pour obtenir des biopsies de ces différents organes exprimant SLC5A8.

L'utilisation de la technique non invasive SPECT pour étudier la perfusion cérébrale et l'exclusion d'iode du cerveau, nous permet d'effectuer plusieurs enregistrements répétés sur un même animal mais, de plus, ces mêmes animaux, après sacrifice, servent également à obtenir les prélèvements d'organes requis. Nous prévoyons donc 740 animaux pour l'ensemble des expériences prévues du projet.

Nous comparerons systématiquement des souris invalidées (SLC5A8 -/-) et des animaux non mutés de la lignée parentale. L'ensemble des souris proviennent d'un élevage interne.

3693. La principale mission du laboratoire est de développer et mettre sur le marché de nouvelles molécules (protéines humaines plasmiques ou recombinantes) à usage thérapeutique pour la prise en charge de pathologies graves et souvent rares, dans le domaine de l'hémostase. Dans le cadre du développement de nouveaux facteurs de la coagulation humains, des études chez l'animal sont requises pour étudier la pharmacocinétique de la molécule. La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. Ces études permettent entre autres de :

- Sélectionner entre différentes formulations celles qui maintiennent le médicament plus longtemps dans l'organisme.

- Sélectionner entre différents médicaments candidats celui qui reste le plus longtemps en circulation.
  - Lors d'un changement de procédé de fabrication, s'assurer que ce changement n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique du médicament.
  - Sélectionner la meilleure voie d'administration (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale,...).
  - Adapter les posologies de traitement aussi bien dans les modèles d'efficacité chez l'animal que dans les essais cliniques chez l'homme.
- De plus, ces études sont réglementairement requises et sont indispensables avant utilisation de la nouvelle molécule dans un essai clinique chez l'homme.

L'objectif de ce projet est d'étudier le profil pharmacocinétique de facteurs de la coagulation humains après administration unique par voie parentérale chez le lapin et les rongeurs (rat et souris). La nouvelle molécule est administrée chez l'animal par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire et des prélèvements sont effectués à différents temps afin de déterminer la concentration sanguine de la molécule au cours de temps. Cette cinétique concentration versus temps permet de déterminer si la molécule reste longtemps en circulation ou si elle est éliminée rapidement, quelle est la concentration maximale, quelle est l'exposition totale de l'animal à la molécule, si la molécule reste majoritairement en circulation ou si une partie va dans les tissus, etc...

La fréquence et le nombre des prélèvements dépendent de la durée de vie de la molécule dans chaque espèce. D'une façon générale, les facteurs de la coagulation ont un temps de demi-vie court (<9 heures) et la cinétique est suivie pendant 2 jours. Le nombre d'animaux par groupe dépend du nombre de prélèvements nécessaires pour suivre la cinétique et le volume de sang récupéré par jour pour chaque animal respecte les bonnes pratiques de prélèvement sanguin en expérimentation animale).

Globalement, le nombre maximal d'animaux estimés durant le projet (3 ans) est de :

- 525 lapins hybrides néozélandais
- 525 rats OFA-SD
- 1170 souris (SwissNude, OF1, ou autre souches suivant les besoins).

Ce type d'expérience ne peut pas être remplacé par des études in vitro. Seul un animal permet d'avoir tous les compartiments d'absorption, distribution, métabolisme et élimination des molécules. Le protocole de l'étude est murement réfléchi afin de ne pas répéter l'étude : 1/ Une revue des données existantes en interne et de la littérature pour des molécules similaires est effectuée. 2/ Le nombre d'animaux par point a été jugé comme minimal mais suffisant pour une interprétation appropriée des résultats. 3/ Plusieurs personnes (techniciens et chercheurs) revoient le protocole afin de s'assurer que tous les paramètres ont bien été évalués.

3694. La principale mission du laboratoire est de développer et mettre sur le marché de nouvelles immunoglobulines (protéines humaines plasmiques ou recombinantes) à usage thérapeutique pour la prise en charge de pathologies graves et souvent rares, dans les domaines de l'immunologie et des maladies rares. Dans le cadre du développement d'un nouveau médicament, des études chez l'animal sont requises pour étudier la pharmacocinétique de la molécule. La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir d'un médicament dans l'organisme. Ces études permettent entre autres de :

- Sélectionner entre différentes formulations celles qui maintiennent le médicament plus longtemps dans l'organisme.
- Sélectionner entre différents médicaments candidats celui qui reste le plus longtemps en circulation.
- Lors d'un changement de procédé de fabrication, s'assurer que ce changement n'a pas d'impact sur la pharmacocinétique du médicament.
- Sélectionner la meilleure voie d'administration (intraveineuse, sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale,...).
- Adapter les posologies de traitement aussi bien dans les modèles d'efficacité chez l'animal que dans les essais cliniques chez l'homme.

De plus, ces études sont réglementairement requises et sont indispensables avant utilisation de la nouvelle molécule dans un essai clinique chez l'homme.

L'objectif de ce projet est d'étudier le profil pharmacocinétique des immunoglobulines humaines après administration unique par voie parentérale chez le rat et la souris. La nouvelle molécule est administrée chez l'animal par voie intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale ou intramusculaire et des prélèvements sont effectués à différents temps afin de déterminer la concentration sanguine de la molécule au cours de temps. Cette cinétique concentration versus temps permet de déterminer si la molécule reste longtemps en circulation ou si elle est éliminée rapidement, quelle est la concentration maximale, quelle est l'exposition totale de l'animal à la molécule, si la molécule reste majoritairement en circulation ou si une partie va dans les tissus, etc...

La fréquence et le nombre des prélèvements dépendent de la durée de vie de la molécule dans chaque espèce. D'une façon générale, les immunoglobulines ont un temps de demi-vie long (>24h), et la cinétique peut être suivie jusqu'à 45 jours.

Le nombre d'animaux par groupe dépend du nombre de prélèvements nécessaires pour suivre la cinétique et le volume de sang récupéré par jour pour chaque animal respecte les bonnes pratiques de prélèvement sanguin en expérimentation animale (20% du volume sanguin prélevé en plusieurs fois sur 24h ou 15% du volume sanguin prélevé en une seule fois).

Globalement, le nombre maximal d'animaux estimés durant le projet (3 ans) est de :

- 720 rats OFA-SD.
- 975 souris (SwissNude, OF1, ou autre souches suivant les besoins).

Ce type d'expérience ne peut pas être remplacé par des études in vitro. Seul un animal permet d'avoir tous les compartiments d'absorption, distribution, métabolisme et élimination des molécules. Le protocole de l'étude est murement réfléchi afin de ne pas répéter l'étude : 1/ Une revue des données existantes en interne et de la littérature pour des molécules similaires est effectuée. 2/ Le nombre d'animaux par point (n=5) a été jugé comme minimal mais suffisant pour une interprétation appropriée des résultats. En effet, s'il y a un problème avec un prélèvement, quatre autres points permettront une bonne interprétation. 3/ Plusieurs personnes (techniciens et chercheurs) revoient le protocole afin de s'assurer que tous les paramètres ont bien été évalués. Les procédures de ce projet sont considérées comme étant de classes modérées.

3695. La myasthenia gravis (ou MG) est une maladie auto-immune touchant la musculature striée squelettique. Il en résulte une faiblesse musculaire fluctuante et une fatigabilité excessive. La MG est caractérisée par une attaque de la jonction neuromusculaire (JNM) post-synaptique par des anticorps (Ac) dirigés notamment contre les récepteurs à l'acétylcholine (RACH). Le pronostic vital du patient peut être engagé si les muscles respiratoires sont touchés. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour la MG. Les traitements actuels proposés aux patients sont essentiellement symptomatiques ou non-spécifiques et doivent être pris à vie.

Le thymus est clairement impliqué dans la pathogénèse. En effet, une hyperplasie thymique caractérisée par la présence de centres germinatifs (impliqués dans la production des anticorps pathogènes) et/ou un thymome sont fréquemment retrouvés chez les patients.

La finalité de nos projets de recherche est de mettre au point de nouveaux traitements plus efficaces pour les patients myasthéniques. Pour ce faire, des modèles animaux pertinents et mimant fidèlement la maladie humaine sont essentiels.

Le présent projet vise (i) à développer un nouveau modèle expérimental de MG chez la souris immunodéficente en greffant des fragments de thymus issus de patients atteints de myasthénie grave et (ii) d'évaluer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses (CSM), cellules multipotentes aux propriétés immunosuppressives dans ce nouveau modèle.

Pour notre modèle « humanisé » de MG, notre choix s'est porté sur la souche NSG, ou NOD scid gammaC KO. Cette souche est très bien documentée et ces souris profondément immunodéficientes sont à notre connaissance les plus permissives à une greffe xénogénique.

Les souris NSG sont accueillies dans l'animalerie du CEF au minimum deux semaines avant la chirurgie.

Le test de candidat thérapeutique sur un organisme entier est une étape nécessaire avant d'envisager des essais cliniques. Nous estimons avoir besoin de greffer 324 souris pour mener ce projet. Ce chiffre ainsi que toute la démarche scientifique a été établi afin de respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) et ainsi obtenir des résultats statistiquement pertinents avec le minimum d'animaux possible. Le raffinement des expériences est assuré par la mise en place de points limites pour éviter l'inconfort et la douleur des souris.

3696. Chaque étude de ce projet vise à évaluer chez le rat ou le lapin l'efficacité antithrombotique d'un candidat médicament.

Le traitement et la prévention des thromboses exposent les patients à un risque accru d'hémorragie. Ce projet vise à accomplir les opérations associées à la première étape du développement préclinique d'un candidat médicament en évaluant chez le rat ou le lapin son efficacité anti-thrombotique et de le comparer à d'autres anticoagulants connus (produit de référence).

Dans ce modèle, un thrombus est induit chez l'animal anesthésié au niveau d'un shunt artério-veineux. Il s'agit d'une circulation sanguine extracorporelle, permettant le passage de sang d'une artère vers une veine. Après un certain temps, un caillot (ou thrombus) se forme dans le shunt. La propriété anti-thrombotique ou pro-thrombotique du candidat médicament est donc évaluée par la mesure du poids du thrombus.

Au cours de chaque étude, les animaux (en général 6 rats ou 6 lapins par groupe) sont traités par voie intraveineuse avant l'induction du thrombus avec le produit testé à 3 doses différentes, un produit de référence ou le véhicule qui a servi à préparer la formulation du produit testé (total de 5 groupes par étude, soit un nombre prévisionnel maximum de 900 animaux sur 5 ans).

Ce projet est réalisé sur le rat ou le lapin car les méthodes de substitution (expériences in vitro) pour évaluer l'activité anti-thrombotique d'un candidat médicament ne sont pas suffisantes (Règle des 3R Remplacement). A ce jour, le rat et le lapin sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude. Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique (Règle des 3R : réduction). Dans ce projet, le raffinement est effectué par la mise au point de procédures rigoureuses, la formation du personnel, la recherche des points limites, le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

3697. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (World Health Organization, 2004), il y a dans le monde 450 millions cas de pneumonie par an, qui sont responsables de 4 millions de morts par an. Selon un rapport conjoint de l'ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) et de l'EMA (European Medicines Agency), 25 000 patients en Europe seraient morts en 2007 d'infections liées à des bactéries multi-résistantes qui n'ont pu être traitées faute d'antibiotiques efficaces. En effet, la recherche de nouveaux antibiotiques est au point mort au niveau industriel, obligeant les médecins à se tourner vers des vieilles molécules qui étaient tombées en désuétude. L'optimisation de l'administration des antibiotiques pour le traitement des infections pulmonaires comme pour toute autre infection, correspond donc à un véritable enjeu de santé publique afin de limiter l'apparition de bactéries résistantes (UE 2011 Plan d'action contre l'antibiorésistance). Cette optimisation passe par de meilleures connaissances des doses, des intervalles de prise ou des voies d'administration.

La colistine est un antibiotique mis sur le marché à la fin des années 1950. Cette molécule a été abandonnée à la fin des années 60 en raison de la commercialisation d'antibiotiques plus facilement maniables et moins toxiques. Toutefois, depuis le milieu des années 2000 et la recrudescence des résistances vis-à-vis des antibiotiques existants, la colistine est revenue sur le devant de la scène comme étant la dernière ligne de défense dans le traitement des infections pulmonaires à bactéries Gram-négatives multi-résistantes. Cependant, peu de données existent dans la littérature concernant la bonne utilisation de cet antibiotique.

Le but de ce projet est donc d'étudier chez la souris infectée l'efficacité du traitement par la colistine. Ce projet est réalisé chez la souris car les modèles murins d'infection pulmonaires à germes sensibles à la colistine sont bien décrits dans la littérature, ce projet va s'organiser en deux étapes :

- La 1ère étape consiste en une étude pharmacocinétique permettant de déterminer la dose à administrer chez la souris infectée afin de déterminer les concentrations thérapeutiques efficaces dans le traitement des infections pulmonaires. Cette première étape implique donc la mesure des concentrations plasmatiques de colistine chez la souris infectée après l'administration de la molécule à différentes doses.

- La seconde étape de ce projet consiste après avoir défini la dose à administrer, à évaluer l'efficacité du traitement chez des souris infectées au niveau pulmonaire. Dans cette partie, une nouvelle technique d'imagerie par bioluminescence évaluant le degré d'infection d'un animal vivant anesthésié et de suivre in vivo l'efficacité du traitement sera évaluée. Cette technique permet d'effectuer des images (totalement indolores pour l'animal) permettant de quantifier le niveau de l'infection chez un même animal vivant et anesthésié. Toutefois, cette technique n'est pas mise au point dans le laboratoire et peu de données existent dans la littérature scientifique. Un travail de mise au point est donc nécessaire et le nombre d'animaux utilisé pour ce travail est de 66. La règle des 3R a été prise en compte dans l'élaboration de ce protocole. En effet, la bioluminescence permet par rapport aux techniques traditionnelles basées sur le sacrifice de l'animal et sur le comptage bactérien au niveau pulmonaire, de réduire le nombre d'animaux utilisés comme préconiser par la règle des 3R. Concernant le raffinement, le point limite de l'expérimentation est caractérisé par la détresse respiratoire c'est à dire des mouvements anormaux de la cage thoracique de l'animal accompagnée d'une cyanose. Le remplacement des animaux est impossible car aucun modèle alternatif n'existe pour mimer les concentrations plasmatiques et pulmonaires à la suite d'une administration de substance médicamenteuse.

3698. Une première étude, que nous avons menée en 2013, nous a permis de sélectionner un produit fromager parmi quatre testés qui avait des effets métaboliques particuliers, en terme d'adiposité.

L'objectif de cette étude est de confirmer l'impact métabolique de la consommation de produits fromagers sur la modulation du développement du phénotype obèse, d'identifier les effets de potentiels de ces aliments sur la santé et d'identifier les ingrédients les plus efficaces, chez la souris. 84 souris mâles seront réparties en 7 groupes et soumises à un régime riche en lipides (High Fat), contenant ou pas des produits fromagers, seront étudiées comparativement à un groupe contrôle, nourris avec un régime normo lipidique et comparativement à deux groupes contrôles positifs HF additionné ou non de cholestérol à des niveaux similaires à ceux mesurés dans les régimes à base de produits fromagers. La prise de poids, d'adiposité et la tolérance au glucose seront mesurés en début et en fin d'étude.

3699. Le projet a pour objectif l'évaluation de traitements mini-invasifs sur un modèle de tumeur VX2 chez le lapin. Différentes études seront réalisées selon le type de traitement testé et selon les objectifs scientifiques (performances, tolérance, efficacité).

Notre équipe travaille dans le domaine de l'oncologie et des thérapies innovantes dites mini-invasives des tumeurs. Ces thérapies peuvent être des traitements chirurgicaux par des techniques percutanées (coelioscopie), des traitements de radiologie interventionnelle avec guidage en temps réel par radioscopie (embolisation, ablation) ou des traitements pharmacologiques par des thérapies ciblées.

L'utilisation du VX2 chez le lapin comme modèle de tumeur a été développée dans les années 50. Le modèle présente l'avantage d'être reproductible, facilement implantable, à croissance rapide et transplantable dans de nombreux organes. De plus, contrairement aux rongeurs, la taille du lapin permet l'utilisation des mêmes appareillages que chez l'homme. Le VX2 est aujourd'hui le modèle tumoral préclinique le plus couramment utilisé en radiologie interventionnelle.

Le projet décrit l'implantation des cellules tumorales VX2 dans le foie de l'animal, le contrôle du développement des tumeurs et les procédures d'interventions classiquement utilisées pour leur traitement. On estime qu'un total de 725 lapins sera utilisé pour les 5 années de la demande d'autorisation de projet.

Principe des 3R :

- Remplacement : La mise au point, l'évaluation et l'optimisation des traitements anticancéreux nécessitent l'utilisation d'un système in vivo reproduisant les conditions pratiques cliniques : conditions d'anesthésie, anatomie et physiologie, matériel utilisé, biologie tumorale pour évaluer la réponse au traitement.

En parallèle, des méthodes alternatives de culture de cellules VX2 seront utilisées pour des tests de prolifération/viabilité sur de plus larges gammes d'agents thérapeutiques (screening) ou pour évaluer les mécanismes moléculaires des traitements ensuite testés in vivo (microarray, RT-PCR...).

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque étude est estimé d'après l'expérience de notre établissement sur le nombre d'individus nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente, classiquement compris entre 4 et 10 animaux par groupe d'étude.

- Raffinement : Un protocole de suivi des animaux et de prise en charge de la douleur, avec évaluation quantitative des paramètres de suivi pour définir le point limite, sont utilisés afin de réduire au maximum la douleur animale.

3700. La maladie thromboembolique veineuse s'exprime sous deux formes principales : la phlébite ou thrombose veineuse profonde et sa complication majeure l'embolie pulmonaire. En effet, plus de 70 % des embolies pulmonaires (EP) sont consécutives à la migration de caillots, ou embols, issus d'une thrombose veineuse profonde (TVP) des membres inférieurs, c'est-à-dire l'obstruction des veines par une thrombose (caillot sanguin).

L'embolie pulmonaire est causée par la présence d'un caillot de sang dans la circulation pulmonaire (poumons). Le caillot de sang provient souvent du système veineux et voyage à travers les veines larges vers le coeur et puis avance vers l'artère amenant le sang vers les poumons. Une fois que cette artère est bloquée la circulation vers les poumons s'arrête ce qui mène à la nécrose du tissu du poumon. Les symptômes dépendent de l'étendue des dommages aux poumons.

On estime à environ 4 millions le nombre de personnes concernées par les maladies thromboemboliques dans les pays industrialisés. La maladie thromboembolique est estimée à 350 000 nouveaux cas par an aux USA avec 240 000 morts par EP, en France 100 000 nouveaux cas par an avec 10 000 morts par EP.

Le filtre cave est un dispositif métallique que l'on implante dans la veine cave. Il s'agit d'un dispositif métallique de forme variable qui est implanté dans la veine cave inférieure pour filtrer le sang revenant des membres inférieurs vers le coeur et les poumons, en empruntant cette grosse veine. Ce filtre laisse passer le sang et retient les caillots qui se sont formés au-dessous de lui. Dans les filtres les plus couramment utilisés, des supports munis de crochets lui permettent de se fixer définitivement dans la paroi de la veine. L'objectif est de prévenir, à tout prix, la migration vers les poumons de caillots formés dans les veines des membres inférieurs ou du petit bassin au cours d'une phlébite. Cette complication appelée embolie pulmonaire, n'est jamais bénigne et parfois mortelle. Elle est fréquente (50%) si la phlébite ne peut être traitée par les anticoagulants en raison d'une contre-indication, ou si ce traitement même bien fait se révèle insuffisant. Dans ces deux cas, la pose d'un filtre dont l'efficacité a été prouvée, devient nécessaire.

Les filtres cave sont utilisés depuis les années 1970 et ont été conçus pour être laissés à demeure dans la veine cave inférieure. Les filtres de dernière génération sont temporaires ou « récupérables ». Ils peuvent être retirés sur recommandation du fabricant entre deux et 12 semaines après leur pose si leur usage n'est plus nécessaire. Cependant, bien qu'ils soient désignés comme récupérables, un certain nombre de filtres récupérables ne peuvent pas être retirés en raison de complications. Le profil de sécurité à long terme de ces dispositifs laissés à l'intérieur du corps reste à déterminer.

Le but de ce projet est d'évaluer, sur un modèle porcin, la sécurité et la performance d'un nouveau filtre cave temporaire. Pour cela, une étude sur 12 porcs de taille réduite sera réalisée, en comparant un groupe (n=6) implanté avec un filtre cave laissé à demeure pendant 3 mois avec un second groupe (n=6) dont le filtre cave sera retiré après 3 mois d'implantation.

Les résultats de l'étude préclinique doivent permettre de démontrer la conformité aux exigences essentielles. Il sera ainsi vérifié, les performances et la sécurité du dispositif. Cette phase animale qui étudiera ce Dispositif Médical dans un territoire approprié (veine cave inférieure) proche de l'anatomie vasculaire de l'homme complétera les informations recueillies en laboratoire.

Le choix de la race (lignée porc FBM) est en accord avec les caractéristiques de ce modèle en ce qui concerne la taille des vaisseaux, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux, en étant au plus proche des exigences médicales pour ce modèle.