



**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 (37)

3701. *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) est une bactérie Gram-négative responsable de 16% des cas de pneumonies nosocomiales, de 12% des infections urologiques iatrogènes, de 8% des infections de plaies chirurgicales et de 10% des infections sanguines. Les individus possédant un dispositif médical dans l'organisme (respirateur, sonde cathéter) ou les patients atteints de mucoviscidose, de leucémie ou de brûlures sont particulièrement sensibles à l'infection à Pa.

La prise en charge de patients ayant une infection à Pa est délicate en raison de la multirésistance de la plupart des souches aux antibiotiques et de l'absence d'émergence de nouveaux antibiotiques dans les dix ans à venir. La recherche actuelle s'oriente vers l'étude des facteurs de virulence (toxines impliquées dans la pathogénicité) et de leur mode d'action afin de limiter le processus d'infection.

Notre projet de recherche s'inscrit dans ce contexte. Pa dispose de plusieurs facteurs de virulence dont certains sont relativement bien caractérisés alors que d'autres, présents dans de nouvelles souches cliniques hyper-toxiques, restent à identifier.

Notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années aux systèmes de virulence de Pa et dispose de souches mutantes permettant de mieux les étudier. Notre laboratoire a pour mission de continuer à étudier activement dans les années à venir les mécanismes de toxicité de ce pathogène et à évaluer les nouvelles souches cliniques.

Les mutants produits sont testés en routine sur des cultures cellulaires et différents paramètres de leurs activités toxiques sont examinés. Cependant, les résultats *in vitro* sont insuffisants pour évaluer la toxicité globale. La toxicité des mutants les plus intéressants ou de certains isolats cliniques doit être évaluée *in vivo* dans des modèles d'infection pulmonaire bien caractérisés, chez la souris, le poumon étant le principal point d'entrée du pathogène chez l'homme. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, en provenance d'élevages reconnus, sont nés et élevés en captivité. Leur nombre (700 souris pour l'ensemble des expériences sur 5 ans, soit environ 140 par an) a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes pour évaluer l'effet de l'agent infectieux. Les lots sont de 5 ou 10 souris suivant le type d'expérience réalisée et le test statistique employé pour analyser les résultats. Le pathogène est introduit dans les voies aériennes par inhalation réalisée sous anesthésie. Les protocoles d'anesthésie sont validés. Les animaux sont soit euthanasiés après quelques heures, soit suivis pour l'examen des symptômes infectieux. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

3702. 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, situé sur la membrane post-synaptique à la jonction neuromusculaire. Ces auto-anticorps altèrent la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle conduisant à une faiblesse et fatigabilité musculaires variables ainsi qu'une atrophie chez certains patients. La réparation et régénération des muscles atteints sont assurées par des cellules souches musculaires appelées cellules satellite (CSs). Cependant, leur implication ainsi que leur fonction dans le muscle au cours de la myasthénie restent encore inconnus. L'objectif du programme de recherche propose donc de caractériser les différences fonctionnelles entre les CSs issues de patients contrôles et de patients myasthéniques. L'analyse des CSs comme élément réparateur du muscle nécessite au préalable que le tissu musculaire soit endommagé et d'un environnement tissulaire adéquate (processus inflammatoire, sécrétion de facteurs de croissance, expression des facteurs de transcription, présence de matrice extracellulaire...). La procédure *in vivo* de régénération musculaire à l'aide d'un modèle animal est donc nécessaire afin d'évaluer la capacité régénérative des CSs. La compréhension du mode d'action de ces cellules nous permettra peut-être de proposer dans le futur une thérapie cellulaire améliorant la fonction musculaire des patients myasthéniques ainsi que leur qualité de vie.

Pour des raisons de « timing » et scientifique, le modèle utilisé est le plus approprié pour cette étude. En effet, les souris ont une capacité de régénération musculaire généralement plus rapide que les autres modèles. De plus, il est plus facile d'obtenir des souris transgéniques nécessaire à notre projet.

Le projet, d'une durée de 3 ans, implique l'utilisation de souris sauvages et transgéniques : 60 souris Pax7-Cre-ERT2 et 120 souris NOD-SCID, nourries et abrévées à volonté. 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. Ainsi, toutes les dispositions visant à prévenir le stress et la douleur seront prises en compte et en charge par un suivi quotidien des animaux.

3703. La formation des étudiants de pharmacie requiert qu'ils soient capables de faire la caractérisation pharmacologique de médicaments potentiels sur des modèles animaux simples, qu'ils sont susceptibles de manipuler dans leur future vie professionnelle. A cette fin, nous organisons plusieurs séances de Travaux pratiques (TP) leur permettant de se familiariser avec l'expérimentation animale *in vivo*. Lors de ces TP, les étudiants étudient les effets comportementaux (tests d'Irwin, test de la plaque chauffante) et physiologiques (inflammation, glycémie ...) de l'administration de différentes substances à des rongeurs (rats ou souris selon les cas). Cela représente, pour l'ensemble des TP de pharmacie, 134 souris et 21 rats par an.

Ces TP permettent également de former les étudiants aux règles d'éthique en expérimentation animale. Nous les sensibilisons au bien-être animal et aux conditions d'hébergement et de manipulation des animaux. Enfin, afin de minimiser le nombre d'animaux et dans la mesure où les procédures mises en œuvre sont de classe " légère", les animaux pourront être réutilisés d'une séance de TP à l'autre.

3704. La prévention et le traitement des maladies infectieuses constituent une préoccupation importante de santé. Contrairement à la vaccination « classique » stimulant le système immunitaire hôte par contact avec une forme atténuée ou inactivée d'un agent infectieux et générant ainsi une immunité humorale, une autre approche de la vaccination consiste à stimuler non seulement la sécrétion d'anticorps mais également la réponse immunitaire cellulaire afin de potentialiser l'efficacité vaccinale. Une des pistes de développement s'appuie sur l'utilisation des vecteurs lentiviraux grâce à leur capacité à transduire efficacement les cellules du système immunitaire, dont les cellules présentatrices d'antigène i.e. les cellules dendritiques, outil clé pour le développement de protocoles de vaccination antivirale, antibactérienne, antiparasitaire et antitumorale. L'administration de vecteurs lentiviraux permet de générer, après injection unique chez les animaux de laboratoire, une réponse cellulaire T primaire forte et multi-spécifique ainsi qu'une réponse mémoire efficace. L'objectif du projet présenté ici sera d'évaluer la sécurité, l'innocuité et l'immunogénicité de nouveaux candidats vaccins basés sur la technologie des vecteurs lentiviraux lors d'essais de vaccination thérapeutiques ou prophylactiques appliqués à différentes pathologies, avec pour finalité l'évaluation clinique de ces candidats vaccins.

Nous utiliserons des souris et rats immunocompétents ou ayant un déficit immunitaire, en fonction de l'application vaccinale. Après l'administration du vaccin, la sécurité, l'innocuité et l'immunogénicité seront étudiés.

Bien que les tests sur des cellules en culture (in vitro) fournissent certaines informations sur la fonctionnalité des vecteurs lentiviraux, il est indispensable de confirmer leur efficacité vaccinale in vivo, notamment en ce qui concerne la réponse mémoire et leur capacité de protection contre la pathologie ciblée. De plus, comme pour tout produit expérimental dont l'objectif final est une utilisation chez l'Homme, les nouveaux candidats vaccins développés seront évalués dans un ou plusieurs modèles animaux. En effet, les études sur des modèles précliniques sont requises par la réglementation relative à la demande d'autorisation d'essai clinique (cf directive 2010/82/01 « indications détaillées portant sur la demande présentée aux autorités compétentes en vue d'obtenir l'autorisation de procéder à l'essai clinique d'un médicament à usage humain [...] ») ainsi que par la procédure de demande d'autorisation de mise sur le marché (cf directive 2001/83/CE « instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain »)

Jusqu'à 12280 souris et 6280 rats seront utilisés sur 5 ans dans le cadre du projet présenté ici.

Le bénéfice attendu est une meilleure compréhension de la fonctionnalité des vecteurs lentiviraux en tant qu'outils de vaccination matérialisée par le lancement des études précliniques et cliniques sur des applications antivirales, antibactériennes, antiparasitaires, antitumorales ou autres types des cancers en vue d'une mise sur le marché.

Bien qu'aucune toxicité liée à l'injection des vecteurs lentiviraux n'a été observée jusqu'à présent chez l'animal, il est indispensable de poursuivre cette évaluation pour les futures applications vaccinales qui présenteront un transgène spécifique. Enfin, des essais d'innocuité spécifiques seront réalisés pour les applications vaccinales en cancérologie dans lesquels des animaux immuno-déficients seront suivis après l'administration des vecteurs lentiviraux afin d'évaluer tout potentiel cancérigène. L'état des animaux sera suivi pour évaluer tout signe clinique pouvant illustrer leur mal être : fatigue, appétit, léthargie, poids, etc. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Les animaux seront euthanasiés en cours d'étude si leur état se dégrade conformément aux règles d'éthique, de principes BPL et à la fin de l'étude.

Quand cela s'imposera, des biostatisticiens seront consultés et participeront à l'élaboration des protocoles d'étude afin de garantir que le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé sera utilisé.

Les animaux immuno-déficients seront maintenus dans un environnement protégé approprié pour réduire le risque d'infection avant le démarrage du protocole. Tous les animaux seront hébergés en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

3705. Chez le porc, la grippe est une affection virale due à des virus Influenza A très fréquente et très pénalisante pour la filière. On estime que près de la moitié des élevages en France est concernée par la grippe et près de 30% sont concernés par une forme récurrente au sein de l'élevage s'exprimant sous forme d'infections répétées survenant systématiquement sur tous les lots de porcs à un âge déterminé. La grippe du porc est aussi une zoonose, les virus influenza porcins ayant un potentiel de transmission à l'Homme avéré. La circulation permanente et parfois concomitante de différents virus Influenza A au sein des élevages, notamment dans le contexte de grippe récurrente, favorise à la fois l'exposition de l'Homme et les phénomènes de réassortiments génomiques viraux, lesquels peuvent conduire à l'émergence de nouveaux virus à potentiel zoonotique accru. Parmi les facteurs favorisant cette récurrence sur tous les lots d'animaux, un défaut de réponse immunitaire humorale et une durée d'excrétion prolongée ont été mis en évidence chez des porcelets infectés jeunes (avant 50 jours d'âge) et en présence d'immunité d'origine maternelle. Une relation forte a été établie entre ce niveau d'immunité passive chez le porcelet au moment de son infection et son absence de réponse immunitaire de nature humorale. L'objectif de cette étude expérimentale est d'explorer les mécanismes associés au défaut de réponse immunitaire au virus de l'influenza porcine observé dans les études réalisées en élevage. Elle mettra en jeu des porcelets nés de truies EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) non immunes d'une part, et des porcelets nés de truies EOPS vaccinées d'autre part. Au total 92 porcs seront utilisés. Le projet permettra (i) une évaluation de la sensibilité de porcelets vis-à-vis d'une infection survenant en présence d'immunité passive, comparativement à la sensibilité de porcelets dépourvus d'immunité maternelle ; (ii) une estimation du potentiel de transmission du virus des porcelets infectés à des porcelets contacts (toujours en présence ou non d'immunité passive) ; et (iii) une évaluation de la qualité de la réponse immunitaire post-infectieuse chez les porcelets présentant ou non des anticorps maternels au moment de l'infection. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des 3R (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner), en particulier, le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement robustes.

3706. L'appareil cardio-vasculaire est, avec l'appareil respiratoire et le système nerveux central, l'une des 3 fonctions vitales dont les perturbations éventuelles par les médicaments doivent obligatoirement être recherchées avant les tout premiers essais cliniques chez l'homme. A un stade très précoce du développement des médicaments, notamment pour ceux dont la synthèse s'avère complexe ou onéreuse, les quantités disponibles, pour une évaluation initiale de leurs effets bénéfiques ou toxiques, sont le plus souvent faibles, d'où la nécessité de recourir à des espèces de rongeurs dont le poids corporel plus réduit requiert une moindre quantité de produit pour cette évaluation, contrairement aux études strictement réglementaires réalisées plus tard au cours du développement. Par ailleurs, les produits issus de techniques innovantes (biopharmaceutiques) imposent souvent le recours à des modèles murins, car ce sont les seuls modèles pertinents dont on dispose actuellement. Il a été bien démontré que la télémetrie est un outil fiable pour évaluer la pression artérielle et

l'électrocardiogramme. Etre en mesure de réaliser cette évaluation chez la souris et le rat constitue un apport indéniable à l'évaluation préclinique de la sécurité des médicaments, à un stade très précoce de leur développement. L'objectif de ce projet est de mettre en place une méthode télémétrique permettant d'évaluer les effets indésirables potentiels des médicaments sur l'appareil cardio-vasculaire, chez des animaux vigils, souris et rat.

Il n'existe aujourd'hui aucun test in vitro permettant de proposer une alternative validée ni scientifiquement ni réglementairement. Le nombre d'animaux testés (5 mâles et 5 femelles par dose et par médicament) est le nombre minimum permettant d'atteindre la puissance statistique nécessaire. La première étape de ce protocole prévoit donc 160 rats et 160 souris. Le protocole expérimental a été défini pour limiter le mieux possible la souffrance des animaux (prémédication, anesthésie générale, traitement analgésique post-chirurgie sur plusieurs jours, surveillance monitorée pendant la phase de réveil, période de récupération de 10 jours avant inclusion dans l'étude). Le choix de la méthode télémétrique assure également, une fois passée la phase invasive d'implantation, que les animaux puissent se déplacer à leur guise, sans autre contrainte ni souffrance. Enfin, l'évaluation des effets indésirables des médicaments sur la pression artérielle et l'électrocardiogramme doit toujours se faire à des doses qui n'entraînent pas de toxicité générale manifeste chez les animaux.

3707. Les Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (E.S.T.) sont des maladies neurodégénératives à l'issue toujours fatale qui affectent l'homme et certains animaux.

Les EST seraient le résultat d'un désordre protéique qui conduirait à l'accumulation d'une protéine normale (PrPC) sous une forme pathologique (PrPSc) dans le système nerveux central. La protéine PrPSc serait le constituant essentiel de la particule infectieuse. Par ailleurs, la présence de la PrPC s'est avérée indispensable pour le développement de l'infection et de la maladie et son expression dans les cellules nerveuses nécessaire à la manifestation des phénomènes de dégénérescences associées. La protéine prion est présente dans de nombreux phyla, tels que les mammifères, les amphibiens, les oiseaux, les mammifères marins et les poissons.

L'inoculation d'un prion issu d'une espèce donnée à une autre espèce hétérologue peut diminuer fortement l'efficacité de la transmission (barrière d'espèce). L'effet de la barrière d'espèce s'amenuise au fur et à mesure des sub-passages reflétant l'adaptation de la souche de prion à son nouvel hôte. L'importance de la PrP de l'hôte dans la barrière d'espèce a été démontrée grâce à la réalisation d'animaux et notamment de souris transgéniques.

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est une espèce bien adaptée pour des études de physiopathologie affectant le développement et le tissu nerveux central. L'utilisation du poisson zèbre se généralise grâce aux nombreux outils d'imageries et de génétiques associés.

A ce jour des tentatives d'infections expérimentales de poissons par des prions ont plusieurs fois été tentées, sans succès apparent. Nous proposons de créer des lignées de poissons transgéniques exprimant une protéine prion hétérologue de mammifère. Ces poissons génétiquement modifiés seront infectés expérimentalement par un agent prion homotypique. Si la pathologie se développe, nous pourrions alors étudier en détail la physiopathologie, la neuropathologie et la transmissibilité de cette E.S.T. induite expérimentalement. Dans le cas contraire, il sera intéressant d'analyser l'origine génétique de cette résistance.

Au total, ce projet devrait utiliser environ 250 poissons élevés au sein d'un dispositif expérimental confiné.

Des éléments d'enrichissement sont raisonnés pour éviter tout problème sanitaire (algues, escargot) et réduits à des objets calibrés testés, en particulier pour la mise en reproduction (billes de verre au fond des bacs de pontes, rubans plastiques verts non vulnérants). Les poissons interagissant beaucoup entre eux, ils constituent aussi, les uns pour les autres, un élément très fort d'enrichissement mutuel du milieu.

3708. L'hypertension artérielle est une des maladies les plus fréquentes dans les pays occidentaux. A titre d'exemple, on comptait en France 12 millions de patients hypertendus en 2008. Cette maladie est dite complexe car elle est due à la fois à des facteurs environnementaux et génétiques. Si une alimentation riche en sel est reconnue depuis plusieurs années comme une des causes majeures d'hypertension, les mécanismes responsables de cette sensibilité au sel de la pression artérielle restent encore mal compris.

Une des stratégies d'étude fréquemment utilisées pour comprendre les maladies fréquentes et complexes telles que l'hypertension est l'analyse génétique de syndromes rares et monogéniques, c'est-à-dire causées par une mutation dans un seul gène. L'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (FHHT) est une forme rare d'hypertension humaine. L'étude de ce syndrome s'est révélée passionnante puisqu'elle a permis l'identification de 4 nouveaux régulateurs de la pression artérielle, à savoir les kinases WNK1 et WNK4 et les protéines Cul3 et KLHL3, qui stimulent la dégradation des kinases WNKs, inhibant ainsi leur activité. Lors de la découverte des mutations de ces gènes chez les patients atteints de FHHT, aucune donnée de la littérature ne permettait d'expliquer comment ces mutations peuvent conduire au développement de ce syndrome. Nous avons donc développé plusieurs modèles de souris afin d'identifier les mécanismes mis en jeu par ces différentes protéines pour réguler la balance du sel et donc la pression artérielle. Des modèles animaux sont absolument nécessaires à ces études car le rein, organe responsable du maintien de la balance du sel, est un tissu complexe, composé de plusieurs types cellulaires qui travaillent de concert sous l'influence de nombreuses hormones et facteurs extracellulaires tels que la concentration en sel. Il est donc très difficile voire impossible de reproduire fidèlement l'ensemble de ces interactions in vitro, dans des modèles de cellules isolées.

Les techniques utilisées sont la caractérisation du bilan du sel dans des cages dites métaboliques, des prélèvements sanguins pour mesurer la concentration en sel, la mesure de la pression artérielle et l'injection de molécules anti-hypertensives identiques à celles utilisées chez les patients. Le nombre maximal de souris nécessaires à la conduite de ce projet de 5 ans est évalué à 8520 au maximum.

3709. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central. Elle se caractérise par une attaque de la myéline des patients par leur propre système immunitaire. Une composante neurodégénérative, en lien avec la démyélinisation, contribue également à la mise en place des symptômes. Il existe plusieurs formes de SEP : dans la majorité des cas, le décours de la maladie se distingue par la succession de périodes de poussées et de rémissions, de durée et de fréquence variables, correspondant à des cycles d'apparitions de symptômes et de récupération totale ou partielle ; dans un nombre plus restreint de cas, la maladie se déroule selon une aggravation constante des symptômes, sans cycle de poussées et rémissions.

D'un point de vue physiopathologique, les cycles de poussées et rémissions correspondent à des phases de démyélinisation et de remyélinisation, associés à des statuts neuroinflammatoires différents. Des dommages axonaux, constituant la composante neurodégénérative de la maladie apparaissent au cours de la maladie, et peuvent conduire à des dommages irréversibles. Deux millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde, dont 80.000 en France. L'apparition de la SEP se situe typiquement entre 20 et 40 ans. Elle constitue pour cette raison la deuxième cause d'handicap moteur du jeune adulte.

La prise en charge de la maladie consiste en des traitements de la poussée (corticothérapie) et des traitements de fond, associant kinésithérapie et prise en charge médicamenteuse. Si cette prise en charge permet d'améliorer la qualité de vie des patients, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement médicamenteux permettant de guérir la SEP.

L'objectif principal du présent projet est de proposer une nouvelle cible thérapeutique pour lutter contre cette maladie : l'activateur tissulaire du plasminogène, dont l'action pourrait se faire sur le système immunitaire, la barrière hémato-encéphalique et la myélinisation, trois éléments centraux dans la pathologie de la SEP.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous :

Réduire, remplacer : La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la sclérose en plaques. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant en partie les caractéristiques de la SEP : l'encéphalite auto-immune expérimentale chez la souris. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier la SEP. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale.

Ces études seront réalisées en parallèle avec des études *in vitro* (modèle de barrière hématoencéphalique, cultures de progéniteurs d'oligodendrocytes, culture de cellules immunitaires). La réalisation de ces expériences *in vitro* est de nature à réduire le nombre d'animaux utilisés dans les procédures d'expérimentation décrites dans ce projet. Toutefois, les expériences *in vivo* ne peuvent pas être totalement remplacées par des études *in vitro* pour la bonne réussite de ce projet. En effet, des études dans des modèles animaux intégrés sont nécessaires pour la validation des données obtenues *in vitro* et pour la future translation à la santé humaine. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Raffiner : en vue de minimiser la douleur et la détresse, et d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans ces études, des soins particuliers seront appliqués aux conditions d'élevage par rapport à des conditions standards, de façon à palier aux signes cliniques moteurs induits par le modèle de sclérose en plaques (massage des animaux pour faciliter la mixtion, réduction du nombre d'animaux par cage, placement de la nourriture sous forme de bouillie à une hauteur réduite).

Le nombre total d'animaux à utiliser pour ce projet est de 1000 souris

3710. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central. Elle se caractérise par une attaque de la myéline des patients par leur propre système immunitaire. Une composante neurodégénérative, en lien avec la démyélinisation, contribue également à la mise en place des symptômes. Il existe plusieurs formes de SEP : dans la majorité des cas, le déroulement de la maladie se distingue par la succession de périodes de poussées et de rémissions, de durée et de fréquence variables, correspondant à des cycles d'apparitions de symptômes et de récupération totale ou partielle ; dans un nombre plus restreint de cas, la maladie se déroule selon une aggravation constante des symptômes, sans cycle de poussées et rémissions.

D'un point de vue physiopathologique, les cycles de poussées et rémissions correspondent à des phases de démyélinisation et de remyélinisation, associés à des statuts neuroinflammatoires différents. Des dommages axonaux, constituant la composante neurodégénérative de la maladie apparaissent au cours de la maladie, et peuvent conduire à des dommages irréversibles.

Deux millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde, dont 80.000 en France. L'apparition de la SEP se situe typiquement entre 20 et 40 ans. Elle constitue pour cette raison la deuxième cause d'handicap moteur du jeune adulte.

La prise en charge de la maladie consiste en des traitements de la poussée (corticothérapie) et des traitements de fond, associant kinésithérapie et prise en charge médicamenteuse. Si cette prise en charge permet d'améliorer la qualité de vie des patients, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement médicamenteux permettant de guérir la SEP.

La recherche fondamentale et appliquée sur la SEP utilise des modèles animaux, tel que le modèle d'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE). Dans ce modèle d'EAE, les symptômes sont à l'heure actuelle estimés par l'utilisation d'un score clinique, basé sur l'observation des animaux et donnant des données plus qualitatives que quantitatives. De plus, l'intervention de l'expérimentateur dans cette observation clinique questionne la totale objectivité des résultats obtenus. Enfin, la reproductibilité intra-animal de ces tests et leur dispersion inter-animal importante posent des problèmes d'ordre statistique et obligent à utiliser des échantillons d'animaux relativement grands (de l'ordre de 20 animaux par condition expérimentale).

L'objectif principal du présent projet est de proposer un nouveau score clinique composite, réellement quantitatif, objectif, reproductible, de faible dispersion interanimal et limitant les échantillons d'animaux. Ce score composite sera basé à la fois sur des tests de comportement et sur l'utilisation de l'imagerie moléculaire IRM de l'inflammation.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacer : Les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes

3711. La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central. Elle se caractérise par une attaque de la myéline des patients par leur propre système immunitaire. Une composante neurodégénérative, en lien avec la démyélinisation, contribue également à la mise en place des symptômes. Il existe plusieurs formes de SEP: dans la majorité des cas, le déroulement de la maladie se distingue par la succession de périodes de poussées et de rémissions, de durée et de fréquence variables, correspondant à des cycles d'apparitions de symptômes et de récupération totale ou partielle; dans un nombre plus restreint de cas, la maladie se déroule selon une aggravation constante des symptômes, sans cycle de poussées et rémissions.

D'un point de vue physiopathologique, les cycles de poussées et rémissions correspondent à des phases de démyélinisation et de remyélinisation, associés à des statuts neuroinflammatoires différents. Des dommages axonaux, constituant la composante neurodégénérative de la maladie apparaissent au cours de la maladie, et peuvent conduire à des dommages irréversibles.

Deux millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde, dont 80.000 en France. L'apparition de la SEP se situe typiquement entre 20 et 40 ans. Elle constitue pour cette raison la deuxième cause d'handicap moteur du jeune adulte.

La prise en charge de la maladie consiste en des traitements de la poussée (corticothérapie) et des traitements de fond, associant kinésithérapie et prise en charge médicamenteuse. Si cette prise en charge permet d'améliorer la qualité de vie des patients, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement médicamenteux permettant de guérir la SEP.

L'objectif principal du présent projet est de proposer une *nouvelle* cible thérapeutique pour lutter contre cette maladie: ADAMTS-4 (A Disintegrin and Metalloprotease with ThromboSpondin repeats 4), qui pourrait jouer sur la remyélinisation, un élément central dans la pathologie de la SEP.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous:

La souris est l'espèce animale la plus étudiée dans le domaine de la sclérose en plaques. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal reproduisant en partie les caractéristiques de la SEP: l'encéphalite autoimmune expérimentale chez la souris. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour étudier la SEP. De plus, notre laboratoire dispose de souris génétiquement modifiées déficientes en ADAMTS-4, un outil très pertinent pour cette étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale.

3712. L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une atteinte neurologique soudaine, secondaire à une lésion vasculaire. Les AVC représentent la troisième cause de mortalité et sont la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés. En France, il y a 130 000 nouveaux cas d'AVC par an, dont 30% mortels à moyen terme. Les principaux facteurs de risque sont l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie, le diabète, et le vieillissement.

La recherche préclinique sur les animaux a déjà apporté une meilleure compréhension de la physiopathologie des AVC et favorisé la réduction de la mortalité et de la morbidité associées à cette maladie. Mais leur traduction en des thérapies aiguës efficaces reste pauvre, hormis la thrombolyse induite par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Néanmoins, du fait de critères d'inclusion stricts, seuls 2-5 % des victimes bénéficient de la thrombolyse. Il est donc urgent de rechercher de nouvelles thérapies à la phase aiguë (et au-delà) afin d'augmenter la proportion de patients traités.

Les protéases, en particulier le plasminogène, les activateurs du plasminogène et les métalloprotéinases, contrôlent de manière critique plusieurs étapes de l'évolution des lésions de l'AVC. Des concepts émergents suggèrent que ces protéases peuvent influencer le sort de tous les types cellulaires constituant « l'unité neurovasculaire », à la fois par des mécanismes extra- et intra- cellulaires. Ces perturbations neuro-vasculaires contribuent au risque de thrombose, à la rupture de la barrière hémato-encéphalique, à la mort neuronale excitotoxique, à l'œdème, aux transformations hémorragiques, à l'inflammation et aussi aux processus de réparation, ceci aussi bien avant que quelques heures, voire même des mois après un AVC.

Notre objectif est de caractériser l'influence de protéases clés avant, pendant et après l'AVC, afin de découvrir de nouvelles pistes diagnostiques/thérapeutiques.

Ce projet s'intègre dans un projet multicentrique européen appelé Protea (Eranet Neuron), regroupant des expertises cliniques et/ou précliniques. Il mutualisera une large échantillothèque répondant aux critères STAIRS (faits pour accroître la chance de transfert des découvertes précliniques vers la clinique dans le domaine des AVC).

Cette étude prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R :

La souris est une espèce très étudiée dans le domaine des AVC. L'anatomie et la physiologie de la circulation cérébrale sont donc parfaitement connues. L'ensemble des connaissances et des acquis (au laboratoire et dans la littérature), ainsi que l'existence de nombreuses souches transgéniques rendent cette espèce particulièrement intéressante.

Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal anesthésié.

Nous nous basons sur notre connaissance de la spécificité/sensibilité de nos méthodes et nous consultons un biostatisticien pour s'assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité.

Le raffinement de notre protocole et l'utilisation de l'IRM contribuent à réduire le nombre d'animaux.

Par ailleurs, l'échantillothèque plasmatique et tissulaire sera disponible pour toute autre étude s'intéressant aux effets du vieillissement et/ou du sexe.

Au total ce projet utilisera un maximum de 700 souris.

3713. Le lipopolysaccharide (LPS) est un composant essentiel de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Cette endotoxine pyrogène promeut la libération de cytokines pro-inflammatoires et peut par conséquent induire chez l'homme des signes cliniques comme par exemple un choc septique. Dans la recherche fondamentale, le LPS est beaucoup utilisé pour induire l'inflammation. Des études récentes chez la souris laisse penser que les plaquettes sanguines auraient un rôle prépondérant et bénéfique dans le maintien de l'intégrité vasculaire dans différents modèles inflammatoires dont le modèle d'inflammation pulmonaire suite à une infection avec du LPS.

L'objectif de ce projet est de vérifier cet effet bénéfique des plaquettes dans le modèle d'inflammation pulmonaire chez l'animal (souris, *Mus musculus*) et déterminer l'importance de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, du récepteur GPVI ainsi que le rôle des agonistes solubles, l'ADP, le TxA2 et la thrombine.

Cette réaction d'inflammation pulmonaire suite à l'injection de LPS sera effectuée sur :

- des souris thrombopéniques (suite à l'injection de l'anticorps R300 thrombopéniant) pour confirmer l'effet des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'un processus inflammatoire.

- et sur 4 types de souris génétiquement modifiées n'exprimant plus certains récepteurs plaquettaires (souris déficientes en intégrine αIIb ; déficientes en intégrine β3 ; déficientes en récepteur P2Y1 ; déficientes en récepteur GPVI) afin de déterminer quels récepteurs sont impliqués dans les réactions d'intégrité vasculaire.

Cette étude pourrait aboutir à l'identification de nouvelles thérapies dirigées contre l'atteinte de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation.

Limitation du nombre d'animaux : Le nombre d'animaux utilisés lors de cette étude est réduit au maximum, avec la contrainte d'obtenir une quantité de matériel suffisante pour chaque expérience, permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Un soin particulier a été apporté pour diminuer la douleur des animaux :

- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 39°C afin lutter contre l'hypothermie.
- Après l'injection retro-orbitale, injection d'un collyre anti-inflammatoire et apaisant.
- Mise à mort des souris par un surdosage d'anesthésiant (mélange de 200 mg/kg de kétamine et 40 mg/kg de xylazine pour éviter toute angoisse et souffrance) avant le prélèvement des poumons.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 310 souris.

3714. La prise en charge de l'arrêt cardiaque chez l'homme comprend, en cas d'absence de reprise d'une circulation spontanée, l'utilisation d'une circulation extracorporelle assurant un flux sanguin continu et une oxygénation par un « poumon artificiel ». Ce dispositif – extra corporeal life support (ECLS) consiste en une pompe à turbine entraînant un flux sanguin continu. L'ensemble du dispositif est d'une part connecté au patient par une canule veineuse et d'autre part à une canule artérielle.

La canule artérielle permet l'injection du sang oxygéné au niveau de l'aorte dans un sens contraire au flux sanguin physiologique – le courant circulatoire étant alors orienté de l'aorte sous rénale vers la crosse de l'aorte. Ce qui augmente les pressions du ventricule gauche (VG), avec des conséquences physiologiques néfastes. Cette situation augmente les résistances à l'éjection cardiaque. Cette augmentation de pression télédiastolique peut conduire à un œdème pulmonaire majeur compliqué d'impossibilité de sevrage ventilatoire et/ou peut entraîner l'apparition d'une hémorragie alvéolaire conduisant finalement à une impossibilité d'oxygénation du sang traversant les poumons. Les traitements préventifs (ballon de contreimpulsion aortique, septostomie percutanée), sont mal tolérés par les patients et ont des conséquences rendant le pronostic difficile. Pour améliorer l'assistance ventriculaire à flux continu, et ses risques de complication (œdème pulmonaire), une ECLS pulsée synchrone est envisagée.

Pour mener cette étude nous proposons d'étudier sur un modèle porcin pathologique en arrêt cardiaque et après ressuscitation les améliorations des constantes hémodynamiques et physiologiques suscitées par un système ECLS pulsée synchrone par comparaison avec la technique habituelle (ECLC flux continu).

Deux lots de 9 porcs (18 porcs) seront utilisés pour cette étude. Les résultats de l'étude préclinique serviront de rationnel pour un projet humain. Ce projet associe une équipe hospitalière de cardiologie humaine et des spécialistes de la cardiologie interventionnelle sur les animaux.

Le choix du modèle porc fait suite aux travaux que nous menons depuis plusieurs mois sur ce domaine de l'arrêt cardiaque réfractaire, et qui nous a permis de valider un modèle remplissant les conditions et contraintes d'un arrêt cardiaque chez l'homme.

Règle des 3R :

- Remplacement : pour répondre aux objectifs de ce projet, il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique qui ne pourront pas nous permettre de mesurer l'amélioration des constantes hémodynamiques et physiologiques suscitées le système de flux pulsatile.

- Réduction : Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux (9 animaux par lot) nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

- Raffinement : les animaux seront sacrifiés en fin de procédure. Les méthodes expérimentales choisies (anesthésie générale et analgésie) éviteront toutes souffrances lors des interventions sur animaux.

3715. Les composés perfluorés ont été très largement synthétisés depuis la fin des années 1940. Ces substances organiques (constituées d'une chaîne carbonée fluorée lipophile et d'un groupement fonctionnel hydrophile) sont utilisés dans des processus industriels (tensioactifs dans la production de polymères) et dans nombre de produits commerciaux (lubrifiants, revêtements de papiers et de textiles, retardateurs de flamme, ...). Compte tenu de la large utilisation de ces composés de synthèse, et grâce aux avancées récentes en chimie analytique, une contamination par les perfluorés de matrices environnementales (milieux aquatiques en particulier) et biologiques (poissons, mais aussi l'homme) a ainsi pu être récemment démontrée.

Une approche classique pour évaluer le potentiel contaminant d'une substance chimique est de déterminer si elle est persistante (P), bioaccumulable (B), toxique (T) et susceptible d'être transportée sur de longues distances. Malgré la controverse à propos de la toxicité des composés perfluorés, leur persistance dans l'environnement est considérée comme un danger. Par ailleurs, les écosystèmes aquatiques sont des récepteurs privilégiés de contaminants ; ainsi les concentrations en perfluorés les plus élevées ont pu être quantifiées chez les poissons, et plus particulièrement ceux ayant un régime alimentaire piscivore.

Aussi parce que les poissons constituent une matrice biologique particulièrement pertinente pour cette classe de contaminants émergents, et plus encore lorsqu'ils appartiennent à un niveau trophique élevé, notre projet vise à étudier la contribution d'un précurseur, le SAMPAP, à la charge en perfluorés (PFOS) chez la perche commune *Perca fluviatilis*. Le protocole expérimental mobilisera 124 poissons maintenus en conditions contrôlés et nourris avec des aliments dopés ou non en SAMPAP. L'objectif est d'évaluer le potentiel de biodégradation du SAMPAP en intermédiaires réactionnels et en PFOS chez cette espèce piscivore.

3716. Le but du projet est de déterminer l'impact sur la régulation métabolique d'une mutation par knock-in dans un gène le rendant insensible à l'AMP. Cette étude vise plus précisément à caractériser les conséquences de cette mutation sur le métabolisme lipidique et glucidique.

L'utilisation de l'animal est indispensable car les interactions entre tous les organes impliqués dans le métabolisme ne peuvent être remplacées par des techniques *in vitro*. De plus, la souris étant l'espèce dans laquelle les mutations génétiques sont les mieux maîtrisées à l'heure actuelle, nous pourrions étudier ce gène en particulier.

Pour cela, un protocole utilisant une cohorte de 20 animaux mâles (10 souris mutées pour le gène d'intérêt et 10 souris contrôles) consistera à étudier les paramètres sanguins et métaboliques. Afin d'éviter tout stress, les prises de sang seront effectuées sous anesthésie générale et un analgésique local sera administré. Cet effectif de 20 animaux sera utilisé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude. Ainsi, les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter toute redondance dans l'étude des phénotypes engendrés par la mutation. Nous n'attendons pas de symptômes dommageables chez ces souris. Cependant, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état général des animaux.

3717. Les cellules de l'organisme s'efforcent de synthétiser les milliers de protéines nécessaires à leurs fonctions. Une fois synthétisées, les protéines ont besoin d'être correctement repliées pour accomplir leurs fonctions et pour cela, disposent de mécanismes de contrôle qualité. Ces mécanismes très performants chez les cellules jeunes fonctionnent de moins en moins bien dans des cellules vieillissantes ce qui conduit à des défauts de repliement de protéines. Les conséquences de ces défauts sont très graves. En effet, de nombreuses maladies humaines telles que les maladies neurodégénératives sont dues à l'accumulation de protéines mal repliées. L'objectif de notre projet est de tester une nouvelle approche thérapeutique permettant de stimuler les voies de contrôle qualité ce qui permettrait aux cellules de survivre malgré l'accumulation de protéines mal repliées. Cette approche, basée sur une petite molécule chimique (non mutagène, n'ayant entraîné

aucun effet secondaire au cours d'un traitement de 5 mois, même pour une dose 10 fois supérieure à celle choisie pour ce projet), est potentiellement utile pour guérir de nombreuses maladies causées par l'accumulation de protéines mal repliées.

Nous avons choisi en première approche un modèle de rétinite pigmentaire (RP) pour les raisons suivantes :

- 1.) Nous savons que la voie cellulaire que nous ciblons avec notre petite molécule joue un rôle clef dans la dégénérescence de la rétine.
- 2.) Nous avons confirmé que des administrations orales de notre composé permettent d'atteindre des doses efficaces dans la rétine.
- 3.) Nous savons qu'un traitement de 6 mois avec notre composé n'entraîne pas d'effets secondaires.

Il est essentiel de valider l'intérêt de cette approche dans des modèles animaux appropriés.

Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées homozygotes ou hétérozygotes pour la mutation de la rhodopsine (P23H). L'utilisation d'un mammifère est indispensable lors des tests précliniques afin d'évaluer la tolérance et l'efficacité du traitement avant d'envisager une étude clinique ultérieure chez l'Homme. La mutation génétique étudiée entraîne une perte de vision progressive chez l'animal en absence de traitement efficace, le but de cette étude est d'évaluer l'effet du traitement sur la dégénérescence rétinienne. Un total de 120 souris divisées en 10 groupes d'étude (12 souris par groupe et 6 souris par sexe) a été défini comme nombre optimal pour obtenir des résultats statistiques. De plus, parmi les 12 souris, un groupe de 24 souris WT sera évalué en parallèle par une étude comportementale afin de vérifier l'absence d'effets secondaires du traitement sur le système cognitif des animaux. En effet, il s'agit d'une étude pharmacologique dans laquelle l'efficacité du traitement test sera comparée à celle d'une molécule placebo sur des groupes de souris mutantes versus des souris sauvages. Les analyses faites sur ces animaux seront optimisées afin d'éviter tout duplicata d'étude. De plus, les animaux seront pesés de façon hebdomadaire et euthanasiés dès les premiers signes de perte de poids (>20%) ou s'ils présentent des signes de douleur chronique tels que des poils hérissés ou un dos voûté.

Finalement, l'approche thérapeutique proposée est « sûre » et il est important de valider son intérêt pour qu'elle puisse être développée et apporter un bénéfice à la santé humaine.

3718. Les canaux potassiques de fond à deux domaines pores (K2P) forment une famille de 15 canaux hyperpolarisants inhibiteurs.

Ils sont exprimés dans le système nerveux et les cellules polarisées dont ils régulent l'activité. Ce projet de recherche vise à étudier le rôle des canaux K2P dans les douleurs provoquées par une hyperactivité des neurones sensoriels, que se soit consécutif à une inflammation ou une neuropathie chimio-induite.

De nombreuses recherches ont montré que les canaux K2P sont régulés par divers paramètres physiologiques et, en conséquence, ils sont impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques (sécrétion hormonale, fonction rénale, tonus cardio-vasculaire, mémoire, dépression, neuroprotection, anesthésie...). Nous avons récemment montré l'implication des K2P de la famille TREK dans la nociception. Au vu de cette découverte et de la modulation des K2P par des facteurs proinflammatoires, nous projetons d'étudier le rôle de ces canaux dans la douleur par excès de nociception provoquée par des hyperactivités des neurones sensoriels en condition inflammatoire et en condition neuropathique chimio-induite par l'oxaliplatine, un sel de platine de 3ème génération utilisé en thérapie anticancéreuse. L'oxaliplatine provoque une neuropathie des neurones périphériques qui induit une allodynie au froid chez pratiquement tous les patients traités contre le cancer, ce qui altère la qualité de vie et affecte le traitement anticancéreux. La neuropathie chimio-induite est la conséquence d'une hyperactivation des neurones sensoriels par les changements de température. Les canaux K2P étant de puissants régulateurs de l'activité électrique des neurones sensoriels, ils pourraient être impliqués dans ces douleurs d'origine périphériques.

Pour cette étude, nous utiliserons un modèle de douleur inflammatoire en injectant un agent pro-inflammatoire, la carragénine, en sous cutané dans la patte de souris adultes (8 à 16 semaines) de fond génétique C57black6/j mutées pour les gènes codants pour les canaux TREK1, TREK2, TRESK, TASK. Puis, nous utiliserons un modèle de douleur neuropathique chimio-induite par une injection unique intrapéritonéale d'oxaliplatine chez la souris adulte (8 à 16 semaines) de fond génétique C57black6/j à des doses équivalentes aux traitements utilisés en clinique. Nous pourrons ensuite mesurer l'activité des neurones sensoriels après mise en culture primaire et l'activité des fibres sensorielles isolées par des techniques d'enregistrements électrophysiologiques in vitro et ex vivo en conditions normales et pathologiques, inflammation et neuropathie. Nous utiliserons des souris invalidées pour les gènes codant pour les canaux K2P d'intérêt pour les comparer aux souris « sauvages ». A notre connaissance, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de remplacement permettant de répondre à la problématique posée. Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet sera réduit au minimum nécessaire et suffisant pour pouvoir répondre à la problématique avec des résultats statistiquement exploitables étant donné la très grande variabilité des activités des neurones sensoriels. Nous prévoyons d'utiliser 10 animaux par condition expérimentale testée ainsi que pour les témoins pour un nombre total de 400 souris. L'effectif de 10 animaux par condition expérimentale est une approximation statistique car la variabilité réelle sur animal vivant des effets de l'injection i.p. d'oxaliplatine sur les souris mutées est méconnue, de même que l'amplitude de l'effet sur le comportement qui devra être observé. Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude pourra être réduit si l'amplitude de l'effet sur l'observable s'avère suffisante pour avoir une validation statistique avec un nombre réduit d'animaux. Les différentes étapes prévues dans ce projet ne seront réalisées que si les étapes précédentes le justifient, et le nombre de souris sera réduit dès que possible. Pour éviter toute redondance des résultats, nous effectuons une veille bibliographique mondiale permanente. Dans un souci de raffinement nous apporterons un soin particulier à la surveillance de nos animaux en expérimentation en prévoyant mise en œuvre de points limites précoces et adaptés afin d'éviter toute souffrance excessive lors de nos expériences. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle des canaux K2P régulateurs dans la physiopathologie de la douleur en conditions d'inflammation et de neuropathie chimio-induite, et à terme, de pouvoir établir de nouvelles cibles thérapeutiques.

3719. Il existe un déséquilibre dans le régime alimentaire occidental entre les acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$ qui peut entraîner un excès d'acide arachidonique, qui est le principal $\omega 6$ des membranes neuronales. Nous avons montré précédemment que la libération d'acide arachidonique était induite par l'agent neurotoxique principal de la MA (le peptide β - amyloïde), c'est pourquoi nous nous intéressons ici à une enzyme clé impliquée dans l'incorporation de l'ARA dans les membranes : l'acyl CoA synthétase 4 (ACSL4). L'objet de ce projet est d'étudier le rôle d'ACSL4 dans l'incorporation de l'ARA au sein des membranes neuronales et dans la toxicité des oligomères solubles du peptide β -amyloïde (A β Os).

Pour ce projet, en l'absence d'une lignée de souris invalidée pour le gène ACSL4, nous diminuerons l'expression intracérébrale de l'enzyme ACSL4 dans des souris de la lignée Balb/c RJ de phénotype sauvage en leur injectant des petits ARN interférents (siRNA) dans les ventricules cérébraux. Cette étape nécessite 5 groupes de 5 souris par groupe pour choisir la dose de siRNA appropriée et vérifier l'efficacité de deux injections à 5 jours d'intervalle. Cette mise au point du modèle nécessite donc 25 souris.

De plus, la formation pour la stéréotaxie nécessite 10 souris. Après avoir mis au point les conditions d'invalidation d'ACSL4, nous soumettrons deux groupes d'animaux soit à un régime alimentaire standard soit à un régime enrichi en $\omega 6$ pendant 10 semaines. Nous

testerons la sensibilité des animaux aux effets neurotoxiques d'AβOs, également injectés dans les ventricules cérébraux en une dose unique, par des tests comportementaux de mémoire à court et long terme et une analyse biochimique des marqueurs à la fin du protocole. Les niveaux d'ARA et d'expression d'ACSL4 seront mesurés dans le cerveau. Cette étude nécessite 160 souris réparties en 8 groupes de 20 animaux. Pour chaque groupe, 5 souris seront sacrifiées 5 jours après l'injection d'AβOs et 5 souris seront sacrifiées 10 jours après l'injection d'AβOs afin d'étudier les niveaux d'expression géniques et les distributions lipidiques sous l'influence du traitement par les siRNA; 10 souris seront utilisées pour les études de comportement et sacrifiées 15 jours après l'injection d'AβOs. Ce nombre est suffisant et nécessaire pour obtenir de bonnes interprétations statistiques des résultats.

Le projet nécessite donc 200 souris : 10 pour la formation pour la stéréotaxie, 30 souris pour la mise au point du modèle de sous-expression d'ACSL4 induite par les siRNA, et 160 souris pour l'étude du rôle d'ACSL4 dans l'incorporation d'ARA au sein des membranes neuronales et dans la toxicité des AβOs.

Pour cette étude, la règle des 3R est respectée :

- Réduire : le nombre d'animaux utilisé est le nombre minimal permettant d'obtenir de bonnes interprétations statistiques des résultats.
- Raffiner : les procédures utilisées, les injections intracérébroventriculaires (ICV), sont de classe modérée. L'administration par voie intrapéritonéale du mélange kétamine/xylazine permet le maintien de l'anesthésie pendant toute la durée de l'opération. Une procédure d'analgésie est mise en place après l'opération avec une injection sous cutanée de Métacam®, un inhibiteur des cyclooxygénase.

L'injection sera unique après les régimes alimentaires et avant l'ICV, à dose faible. Le Métacam® n'a pas d'action démontrée sur les enzymes mobilisant l'ARA, phospholipases A2 et acyl-CoA synthétases dont l'ACSL4. L'administration du Métacam® dans ces conditions ne peut donc avoir d'impact sur les effets biologiques testés dans notre étude.

Les animaux seront surveillés quotidiennement tout au long de l'étude et de manière continue durant les heures suivant l'opération. Lors des 3 jours suivants (de J1 à J3), c'est-à-dire jusqu'au début des analyses comportementales, les souris sont surveillées 2 fois par jour.

Les points limites à surveiller tout au long de l'étude et durant le suivi postopératoire sont : l'altération de l'état général, une perte de poids supérieure à 10%, apparition de tremblements, prostration, diminution de l'activité motrice et de la réactivité aux stimuli extérieurs, diarrhées prolongées, hypothermie prolongée ; pilo-érection ; tremblements ; respiration anormale ; prostration ; absence de toilettage. L'apparition de signes de souffrance physique, d'hypothermie ou d'anomalies comportementales est particulièrement surveillée lors de la phase de réveil et toute la journée suivant l'opération.

- Remplacer : nous ne pouvons pas remplacer le modèle animal par un autre modèle car nous avons comme double objectif d'évaluer :

· D'une part, l'impact d'un régime enrichi en ARA et d'une sous-expression d'ACSL4 sur la fonctionnalité cérébrale, ainsi que la biodisponibilité cérébrale des lipides alimentaires, notamment leur incorporation neuronale, ce qui nécessite d'utiliser comme modèle d'étude un organisme entier ;

· D'autre part, leur rôle dans la sensibilité des capacités cognitives aux AβOs, ce qui nécessite l'utilisation de modèles animaux soumis à des évaluations comportementales.

3720. Le projet de recherche a pour objectif d'améliorer la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathogenèse et la prévention du diabète et de ses complications. La thématique de recherche se focalise plus prévention et le traitement des complications cardiovasculaires associées au diabète de type 1 (DT1). En effet, malgré une amélioration de la prise en charge, le DT1 reste, à long terme générateur de complications cardiovasculaires sévères, principales causes de mortalité et de morbidité dans la population diabétique.

Le modèle de diabète induit par injection de streptozotocine présente un intérêt non négligeable pour la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la genèse et les complications du diabète. Ce modèle de référence pour l'étude expérimentale du diabète de type 1 récapitule de manière intéressante les principales étapes caractérisant la pathologie humaine.

Si l'activité physique régulière apparaît comme une pierre angulaire dans la prise en charge du diabète, le développement de stratégies cardioprotectrices, contre les dommages oxydatifs induits par des situations ischémiques telles qu'un exercice physique isolé, apparaît nécessaire pour limiter le risque cardiaque et ainsi permettre la pleine intégration de l'activité physique dans la prise en charge thérapeutique du diabète. L'utilisation d'un préconditionnement physique et/ou d'une supplémentation en n-3 PUFA en tant que stratégies cardioprotectrices afin de protéger le myocarde diabétique contre les dommages oxydatifs induits par l'exercice isolé constitue le point particulièrement innovant de ce projet.

Ne pouvant étudier les conséquences d'un développement de la pathologie diabétique dans un système de culture cellulaire, les modèles animaux rongeurs sont un outil de référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans le diabète. Dans cette étude, 40 animaux seront soumis à l'injection de streptozotocine pour développer un diabète. La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Les animaux seront hébergés dans des cages contenant de l'enrichissement (briques de bois à ronger). De plus, une surveillance et une observation des animaux seront réalisés quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. 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.

3721. Actuellement, dans l'espèce équine, plusieurs races ont des effectifs très réduits. Les effectifs de certaines races continuant à diminuer, on peut craindre leur extinction à court terme. Pour faire face au risque de perte de biodiversité et préserver le patrimoine génétique existant il est nécessaire de développer une technique de production et de congélation des embryons équins.

Lorsque les embryons sont collectés dans l'utérus de la jument 6 à 7 jours après l'ovulation, la plupart ont une taille supérieure à 300µm, et ont par conséquent un faible taux de survie après congélation. Les jeunes embryons, de taille inférieure à 300µm, ont un meilleur taux de survie après congélation. Notre objectif est donc de développer une technique de production in vitro de jeunes embryons équins.

Nous avons précédemment développé une technique de fécondation in vitro (FIV) qui permet d'obtenir des embryons au stade une cellule. Au cours des 3 prochaines années, nous souhaitons développer une technique de culture in vitro de ces embryons.

Pour cela, chaque année, nous prélèverons des ovocytes sur les femelles de notre troupeau expérimental équin par ponction folliculaire transvaginale sous échographie, technique classiquement utilisée en FIV humaine. Nous prélèverons du sperme sur les étalons de notre troupeau expérimental par la technique utilisée en routine dans l'élevage, et nous réaliserons des FIV. Les embryons obtenus seront cultivés in vitro dans différentes conditions puis analysés. A différents stades de la culture, afin de vérifier la qualité des embryons, quelques-uns seront transférés dans l'oviducte de juments receveuses afin de s'assurer qu'ils peuvent aboutir à une gestation. Nous utiliserons des poneys de type Welsh et des ânesses de notre troupeau expérimental. Chaque année, nous envisageons de prélever des ovocytes sur une dizaine de ponettes par semaine pendant 3 mois, soit un maximum de 140 prélèvements sur 60 ponettes environ, et un maximum de 30 prélèvements

sur 9 ânesses, et de réaliser des transferts sur 6 femelles maximum. Remplacer : Notre objectif étant la conservation des races équines menacées, notre modèle animal ne peut pas être remplacé. Réduire : Depuis plusieurs années nous optimisons la technique de collecte d'ovocytes et de transfert dans l'oviducte afin d'améliorer les rendements de collecte pour réduire le nombre de femelles utilisées. Raffiner : Nous optimisons de plus la technique pour améliorer le bien-être des animaux : antalgiques et tranquillisants appropriés, soins avant, pendant et après la procédure.

3722. La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), est une maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Elle est liée à une anomalie du gène DMD codant la dystrophine, une protéine impliquée dans le soutien de la fibre musculaire. Chez les patients, en l'absence de dystrophine, les fibres musculaires s'abiment à chaque contraction et finissent par se détruire. S'ensuit des cycles de dégénération/régénération. Les cellules souches musculaires (cellules satellites) tentent de régénérer les fibres musculaires lésées, mais ce processus est vite dépassé et la dégénérescence finit par l'emporter. La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie rare. Elle touche chaque année 150 à 200 garçons nouveau-nés en France. Environ 2 500 personnes sont affectées par la maladie en France.

Le rôle de Wnt7a/Fzd7 dans la stimulation de la régénération musculaire a récemment été identifié. Wnt7a agit à 2 niveaux : a) sur les cellules souches musculaires pour promouvoir leur expansion symétrique et b) sur les fibres musculaires pour stimuler une hypertrophie. Il a été montré que l'administration de Wnt7a améliore de façon significative l'état dystrophique des muscles dans le modèle mdx, modèle murin de la DMD.

Ce projet consiste à étudier l'utilité de Wnt7a comme protéine thérapeutique pour la stimulation intrinsèque de la régénération pour le traitement de la DMD. Plus précisément le projet consiste à étudier l'effet de Wnt7a sur des cellules de patients DMD. Il s'agira d'injecter dans des souris immunodéficientes et dystrophiques des cellules humaines de patients DMD traitées avec Wnt7a, afin d'étudier leur capacité à participer à la régénération musculaire ainsi que leur auto-renouvellement. Le choix d'un modèle immunodéficiente et dystrophique est indispensable puisque il s'agit de tester des cellules humaines dans un contexte pathologique. Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection intramusculaire. 148 souris immunodéficientes et dystrophiques seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, les deux TA de chaque souris seront injectés. Les souris sont anesthésiées. Lors de la période post-opératoire les animaux recevront un analgésique. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur.

3723. La dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD) est une maladie génétique rare autosomique dominante avec une progression lente. Les signes cliniques apparaissent vers 50-60 ans et se traduisent par des difficultés de déglutition avec une atteinte des muscles du pharynx et un ptosis - ou chute des paupières - avec une atteinte des releveurs de paupières. Plus tardivement on peut observer une atteinte des muscles proximaux. Cette maladie est due à une dans le gène PABPN1 codant un facteur de polyadénylation ubiquitaire. Même si la mutation génétique est connue, les mécanismes physiopathologiques de cette maladie sont encore à découvrir.

Ce projet consiste à étudier le comportement in vivo de cultures primaires isolées à partir du muscle cricopharyngien de patients OPMD en le comparant à des cultures primaires du même muscle prélevé chez des sujets contrôles, ainsi qu'à des cultures primaires isolées du muscle quadriceps qui nous sert de référence. On étudiera en particulier les populations myogéniques (cellules musculaires) et non myogéniques de ces cultures. Enfin l'OPMD étant d'apparition tardive et les muscles présentant des caractéristiques communes avec un vieillissement prématuré, nous comparerons ces cultures avec des cultures primaires musculaires de sujets jeunes et âgés. Le choix d'un modèle immunodéficiente est indispensable puisque il s'agit de tester des cellules humaines. Egalement un modèle immunodéficiente et dystrophique est indispensable pour analyser le devenir des cellules humaines dans un contexte pathologique. En totale 216 souris immunodéficientes et immunodéficientes/dystrophiques seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, les deux muscles Tibialis Anterior de chaque souris seront injectés. Les souris sont anesthésiées. Lors de la période post-opératoire les animaux recevront un analgésique. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur.

3724. La chirurgie permanente du génome est basée sur l'utilisation d'enzymes capables de couper l'ADN, appelés endonucléases, afin d'introduire une cassure double brin de l'ADN muté. La réparation qui en résulte peut soit restaurer le cadre de lecture du gène par ligation ou, si une séquence identique est disponible, permettre l'intégration d'ADNc correctif par recombinaison homologue.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), est une maladie génétique provoquant une dégénérescence progressive de l'ensemble des muscles de l'organisme. Elle est liée à une anomalie du gène DMD codant la dystrophine, une protéine impliquée dans le soutien de la fibre musculaire. Chez les patients, en l'absence de dystrophine, les fibres musculaires s'abiment à chaque contraction et finissent par se détruire. La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie rare. Elle touche chaque année 150 à 200 garçons nouveau-nés en France. Environ 2500 personnes sont affectées par la maladie en France.

Ce projet consiste à démontrer la faisabilité d'une chirurgie du génome par endonucléases pour la correction du gène de la dystrophine dans des cellules de patients DMD portant différents types de mutations. L'étude in vivo est nécessaire pour tester la faisabilité de cette approche. Il s'agira dans chaque cas de corriger des cellules musculaires de patients in vitro de façon permanente à l'aide de différentes endonucléases et d'injecter les cellules corrigées dans des souris immunodéficientes et dystrophiques afin de vérifier la capacité des cellules corrigées à participer à la régénération musculaire et la restauration de la dystrophine. Le choix d'un modèle immunodéficiente et dystrophique est indispensable puisque il s'agit de tester des cellules humaines dans un contexte pathologique. Pour cela le muscle Tibialis Anterior (TA) a été choisi comme muscle cible de l'injection intramusculaire. 148 souris immunodéficientes et dystrophiques seront utilisées. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans le respect de la règle des 3R, les deux TA de chaque souris seront injectés. Les souris sont anesthésiées. Lors de la période post-opératoire les animaux recevront un analgésique. Suite au réveil, les animaux seront surveillés quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience afin de détecter des signes de douleur.

3725. L'évaluation du risque liée à l'exposition aux nanoparticules présentes dans l'alimentation est une préoccupation majeure en France et dans le monde face à la forte croissance des nanotechnologies dans le secteur agro-alimentaire. Cette question concerne l'ensemble des aliments et matériaux d'emballage des denrées périssables dans lesquels sont incorporées des particules dont l'une des dimensions au moins est inférieure à 100 nm (nanomatériaux). Les plus utilisés comme additifs alimentaires (colorants, agents de texture, anti-agglomérants) sont le dioxyde de titane (TiO₂, E171) ou de silice (SiO₂, E550/551) et l'oxyde de zinc (ZnO), tandis que les particules d'argent (Ag), les nanotubes de carbone (NTC) et les nanofeuillets d'argiles (nanoclays) sont autorisés au contact des aliments et peuvent

migrer dans l'aliment. Ces derniers confèrent une plus grande résistance des contenants en plastique alimentaire (TiN, NTC), ou permettent de renforcer la protection des denrées par les films d'emballage (barrière aux bactéries, aux gaz O₂/CO₂, aux UV). Pour la caractérisation du danger, les études se sont focalisées sur l'exposition professionnelle aux nanoparticules manufacturées, principalement par voie respiratoire, alors que la toxicité après ingestion orale est beaucoup moins étudiée, notamment pour l'exposition buccale, la bouche et l'épithélium sublingual étant les premiers exposés.

Les effets toxiques de la plupart de ces nanoparticules sont bien documentés *in vitro* (stress oxydant, génotoxicité, apoptose, inflammation), mais souvent observés à de fortes concentrations, peu représentatives des niveaux d'exposition chez l'homme, et concernant la voie orale, essentiellement sur des cellules épithéliales intestinales. Un modèle *in vitro* d'épithélium buccal a récemment été développé pour évaluer le devenir de nanobilles de polystyrène dans la bouche. Si la taille des particules conditionne la pénétration au travers des cellules épithéliales, la toxicité associée n'est pas documentée dans ces essais et la transposition à l'homme reste difficile en l'absence de modèles intégrant l'influence du pH et des composants salivaires. Chez l'homme, dans l'exemple du TiO₂ utilisé comme pigment alimentaire en confiserie, pâtisserie (...), l'exposition orale est maximale chez l'enfant et l'adolescent, et peut atteindre 3 mg/kg de poids corporel et par jour, le triple de chez l'adulte. Il est donc important d'étudier le devenir des nanoparticules présentes dans l'alimentation, dès l'épithélium buccal, et d'évaluer la toxicité selon la dose pour chaque nanomatériau d'intérêt.

Les objectifs de ce projet sont donc de caractériser chez le porc le devenir et la toxicité dans la cavité buccale de différentes classes de nanomatériaux utilisés dans le secteur agro-alimentaire, en faisant varier la dose d'exposition au contact de l'épithélium sublingual. Nous comparerons le niveau de pénétration intra-épithéliale et les effets de ces produits à ceux de nanoparticules de référence, fournies dans le cadre du programme de parrainage de l'OCDE pour les tests de sécurité sur les nanomatériaux manufacturés. Nos études porteront sur 6 lots de 30 porcs adultes mâles castrés, soit 180 animaux sur une durée de 5 ans. Chaque lot comprendra 5 groupes de 6 d'animaux. Il s'agit du nombre minimal mais suffisant permettant d'assurer la fiabilité statistique de mesures faites lors de 6 expériences différentes, impliquant des comparaisons à 2 et 4 heures après ingestion orale de nanoparticules tests et de nanoparticules de référence, par rapport à des témoins.

3726. La pré-éclampsie est une pathologie de la reproduction impactant 1 à 5 % des femmes enceintes dont l'étiologie est encore mal connue. Elle se traduit par une augmentation importante de la pression artérielle associée à une protéinurie chez la mère et des anomalies placentaires, en particulier au niveau vasculaire. Cette pathologie a un impact morbide considérable tant maternel que foetal.

Récemment une des équipes partenaires du projet a mis au point un modèle murin de cette pathologie, avec pour la première fois des augmentations de pression artérielle comparables à ce qui se rencontre dans la pathologie humaine. Les premières études ont consisté à bien caractériser ce modèle du point de vue de la pression systolique. Nous proposons aujourd'hui d'utiliser des outils d'imagerie non-invasifs, innovants et potentiellement transférable en clinique pour déterminer s'ils peuvent permettre de mettre en évidence les modifications fonctionnelles placentaires associées à la pré-éclampsie

La mise au point des protocoles d'imagerie dans ce modèle représentatif de la pathologie humaine permettra ensuite un transfert rapide en clinique en cas de succès. Ce projet s'attache à utiliser le moins de souris possible, en déterminant à chaque étape si une technique peut avoir un intérêt avant d'impliquer des animaux supplémentaires pour valider précisément la méthode en comparant à des mesures *ex-vivo*. Le nombre d'animaux est également réduit en suivant chaque individu par des techniques d'imagerie non invasive, évitant des sacrifices à différentes dates. En outre, une même procédure permet de recueillir plusieurs paramètres qui seront évalués indépendamment. Enfin, ces examens d'imagerie (non-invasifs) se font sous anesthésie générale légère, pour éviter tout stress des animaux. Ce projet utilisera au maximum 395 femelles gestantes portant chacune en moyenne 8 embryons.

3727. Le projet s'inscrit dans une étude visant à développer une nouvelle approche thérapeutique afin d'améliorer le dysfonctionnement cardiovasculaire dû à une hyperhomocystéinémie, un facteur de risque cardiovasculaire. Actuellement, seulement la moitié des patients atteints par cette maladie répondent aux traitements sur le marché. C'est pourquoi, notre démarche expérimentale vise à développer d'autres traitements. Notre programme de recherche trouve son originalité par une approche novatrice de biothérapie qui permet d'envisager un traitement curatif et définitif, contrairement à une approche pharmacologique. Les critères pharmacologiques de notre nouvelle thérapie doivent être évalués dans un premier temps sur un modèle animal. La preuve du concept a été obtenue chez un modèle de souris présentant la pathologie par l'utilisation d'un adénovirus adapté au modèle murin. Il est maintenant nécessaire de transférer la technologie vers un vecteur utilisable aussi chez l'homme afin de développer une stratégie thérapeutique qui servira également à la conception d'études précliniques. Les AAV sont très attractifs car ils sont non pathogène et ont démontré au travers de nombreuses études pré-cliniques de thérapie génique leur fort potentiel thérapeutique, conforté par des essais cliniques de phase I à III. Pour cela, nous utiliserons une lignée de souris au stade adulte présentant une hyperhomocystéinémie comparée à son témoin. Notre étude nécessitera 80 souris sur 5 ans (4 groupes de 20 souris nécessaires pour l'étude statistique). En terme de 3R, la réduction viendra du fait que les différentes expérimentations pourront être effectuées sur des mêmes groupes de souris dans la mesure où celles-ci se révèlent non invasive, non douloureuse et non stressante pour l'animal. Les animaux seront surveillés de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité, et s'il n'y a pas de perte de poids au delà de 15%

3728. L'obésité est un problème de santé publique. En effet, la dernière étude épidémiologique de 2012 a montré que 49,6 % des français sont en surpoids ou obèses, c'est-à-dire qu'ils ont un IMC, indice de masse corporelle, supérieur/égal à 25. Ces observations sont d'autant plus importantes que le surpoids et l'obésité peuvent entraîner différentes complications: cardiovasculaires, une insulino-résistance, des dyslipidémies mais également des complications hépatiques. Ces complications hépatiques vont de la stéatose (accumulation de lipides dans le foie) à l'inflammation hépatique ou stéatohépatite pouvant aller jusqu'au cancer du foie. Nous pensons que les macrophages du foie (cellules de Kupffer, KC) tiennent un rôle important dans les mécanismes à l'origine de l'évolution de l'inflammation vers les lésions aggravées du foie (stéatohépatite et cancers). Nous avons montré que l'inflammation du foie liée au surpoids est en partie due à la stéatose et qu'à ce stade, les KC ont accumulé des lipides, dont des espèces toxiques. Cette accumulation de lipides est due à une dérégulation des enzymes du métabolisme lipidique (lipogenèse, synthèse du cholestérol et transporteurs de lipides) et est associée à un profil pro-inflammatoire des KC. Elles induisent un recrutement lymphocytaire augmenté et participent au développement de l'hépatite.

Notre projet vise à prouver que l'utilisation de nanoparticules peut cibler spécifiquement la KC et diminuer l'inflammation hépatique et par conséquent être utilisés comme voie d'administration d'un traitement de l'hépatite au cours de l'obésité. Nous allons inhiber dans la KC la synthèse des lipides ou des céramides en utilisant des nanoparticules véhiculant un inhibiteur chimique ou enzymatique (médicament).

Nous allons ainsi restreindre la quantité de lipides dans la KC afin d'éviter son profil pro-inflammatoire, et l'inflammation qui s'ensuit, au niveau du foie. Dans un but thérapeutique, cette preuve de concept nécessite de prouver :

- 1- Une inhibition efficace spécifiquement dans la KC de la synthèse des lipides et / ou des céramides via les nanoparticules.
- 2- Etablir les quantités nécessaires de nanoparticules à injecter in vivo pour permettre une inhibition suffisante et persistante du profil pro-inflammatoire.
- 3- Evaluer la durée d'inhibition des nanoparticules in vivo afin de déterminer à quelle fréquence on doit injecter les nanoparticules pour un traitement à long terme.

Ces expériences doivent prouver que cette voie peut se dégager comme nouvelle cible thérapeutique.

Pour les expérimentations animales nous travaillerons avec des souris C57Bl/6, adultes. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, raffinement et remplacement) pour déterminer la taille des groupes. Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subies par les animaux, par exemple, en enrichissant les cages avec des rouleaux en cartons ou un bout de bois à ronger. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 682 animaux tous génotypes confondus.

3729. L'angiogenèse joue un rôle important dans la progression du cancer. En effet, pour que la tumeur croisse et s'étende, elle doit obtenir l'oxygène et les nutriments véhiculés par les vaisseaux sanguins et être débarrassée des déchets métaboliques. Or au-delà de deux millimètres cubes, l'oxygène et les nutriments ont de la difficulté à atteindre les cellules au centre de la tumeur, ce qui provoque un état d'hypoxie cellulaire qui

- déclenche l'angiogenèse tumorale.

L'angiogenèse tumorale se produit quand un réseau de vaisseaux sanguins pénètre les tumeurs cancéreuses et prolifère. Les cellules cancéreuses libèrent des molécules qui envoient des signaux conduisant à la production de protéines qui favorisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

- La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est un facteur crucial dans la progression des tumeurs puisqu'elle favorise le passage d'un état de multiplication cellulaire à un état de prolifération incontrôlée caractéristique des cellules tumorales. La
- néovascularisation influence aussi la dissémination des cellules cancéreuses dans l'ensemble de l'organisme, puis la formation de métastases. On a déterminé que le
- niveau de vascularisation d'une tumeur solide est un excellent indicateur de son potentiel métastatique. Dans ce contexte, notre projet est de développer des anticorps contre un facteur angiogénique, l'Adrénomédulline ou contre ses récepteurs afin d'inhiber la croissance tumorale de différents modèles de cancer présents au sein du laboratoire. Le laboratoire souhaite produire 4 anticorps anti-AM, 4 anti-CLR, 4 anti-RAMP-2, 4 anti-RAMP-3 et 4 anti-Chimère par an ce qui fera un nombre maximum de 100 lapins sur 5 ans. Avant chaque injection ou prélèvement, la zone d'intérêt est anesthésiée localement par application d'une pommade 5% EMLA ou d'un patch EMLA. Nous nous assurerons de détecter toute souffrance. Le lapin ne devra pas perdre plus de 20% de son poids. Les animaux seront mis à mort dès l'apparition d'un signe de détresse. Ce nombre de lapins permet de répondre aux besoins en anticorps du laboratoire pour les différentes études menées et de faire face au manque d'efficacité de certains polyclonaux produits. Afin de réduire ce nombre dans l'avenir, nous avons mis en place une collaboration afin d'obtenir des anticorps polyclonaux.

3730. Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier l'innocuité et/ou la tolérance de produits vétérinaires chez le chien. Le produit testé peut être un vaccin ou tout autre produit destiné à traiter un chien.

Pour le développement d'un produit vétérinaire, les différentes formulations candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui est la mieux tolérée par l'animal. L'innocuité au point d'administration doit également être vérifiée.

Chaque test sera réalisé comme suit: pour chaque formulation, un minimum de 5 chiens (ce nombre pouvant aller jusqu'à 30 en fonction des contraintes statistiques) seront traités à la posologie recommandée par le fabricant ou jusqu'à 10 fois la dose. Un groupe d'animaux pourra être inclus pour servir de témoin.

L'innocuité et la tolérance du traitement seront évaluées grâce à des examens cliniques généraux incluant une prise de température rectale et des examens locaux au site d'administration.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 750 chiens.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

3731. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente système moteur adulte (2 à 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants). A ce jour, elle reste une pathologie incurable et toujours fatale, 2 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes, généralement pour cause d'insuffisance respiratoire. La SLA présente des formes sporadiques et familiales ; parmi ces dernières 5 à 20% des cas découlent de mutations du gène de la superoxyde dismutase à cuivre et zinc 1 (SOD1). Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point et reproduisent les principales caractéristiques et les symptômes de la maladie. Ces lignées transgéniques sont à la base des recherches expérimentales menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA.

L'un des symptômes principaux de la SLA est la perte de poids, et l'importance de cette perte de poids est un marqueur pronostique de la survie des patients. Les mécanismes qui provoquent cette perte de poids ne sont pas connus. Récemment, nos travaux ont montré que les patients SLA ne prenaient pas de poids, comme attendu, quand ils sont traités par la pioglitazone. Ceci suggère que les centres de contrôle de la prise alimentaire, situés dans le cerveau dans une région appelée hypothalamus, sont affectés par la maladie.

L'objectif de ce projet de recherche est de déterminer si les modèles animaux de SLA répondent de façon adéquate à des stimuli pharmacologiques affectant la prise alimentaire. Ces expériences permettront de mieux définir les atteintes hypothalamiques dans la maladie et définiront de nouvelles stratégies pour contrecarrer la perte de poids.

Respect de la règle des 3Rs :

Remplacement : La complexité du signal de la perte de poids, nous oblige à travailler chez le mammifère et dans l'animal entier. Il n'est donc pas possible de remplacer le modèle murin par un modèle cellulaire.

Réduction : Ces expériences étant basées sur des paradigmes expérimentaux courts (prise alimentaire sur 24h après une injection unique de molécules pharmacologiques), nous réduirons le nombre d'animaux en faisant de chaque animal son propre contrôle véhicule. Il s'agit du nombre d'animaux nécessaires pour une étude de ce type.

Raffinement : Les animaux seront suivis avant, pendant, et après les opérations pour minimiser leur souffrance, et les traitements adéquats leurs seront prodigués. Environ 300 animaux seront concernés par ces manipulations. A l'issue des expériences, les animaux ne seront pas euthanasiés et serviront à la reproduction de la lignée transgénique.

Au delà de la SLA, ce projet est destiné à contribuer à l'effort commun de recherche sur l'étiologie des maladies neurodégénératives du système moteur.

Le maintien et la production de la souche murine a fait l'objet de plusieurs saisines indépendantes

3732. Dans le règne animal, il existe une différence de comportement entre les individus. Si cette différence est constante dans le temps et suivant les contextes, elle est appelée tempérament ou encore personnalité. Elle se réfère à la configuration particulière des comportements qu'un individu exprime et appartient donc à l'individu. La différence de tempérament a déjà été étudiée chez de nombreuses espèces comme les écureuils, les souris, les caillies ou encore les hamsters dorés. Le tempérament a un intérêt écologique et évolutif car il apparaît comme étant héritable et il peut influencer la manière dont les individus interagissent avec leur environnement et par conséquent la fitness des individus des populations sauvages. La fitness représente la faculté d'un individu à transmettre ses gènes à la génération suivante.

Il a été démontré chez certains mammifères comme le mouton et l'écureuil roux, que la personnalité des individus en milieu naturel était aussi bien reliée à la survie des individus, à leur succès reproducteur qu'à la survie de la descendance. De même, la manière dont les individus perçoivent et réagissent à la prédation va directement influencer leur survie.

L'étude de la personnalité et de la réaction vis-à-vis des prédateurs ont ainsi un rôle important dans la réintroduction des espèces en danger mais aussi dans leur conservation. Le hamster d'Europe, *Cricetus cricetus* est une espèce qui a été inscrite en 1990 comme espèce jugée « en voie de disparition » dans le cadre de la convention de Berne, et en 2009 comme espèce en danger sur la liste rouge de l'union internationale pour la conservation de la nature (UICN). En effet, entre 2001 et 2012, les effectifs des populations d'hamsters d'Europe ont diminué d'environ 75 % en Alsace. Un plan national d'action (PNA) est actuellement en place en Alsace depuis 2012 et jusqu'en 2016 pour tenter de stabiliser la population voire de l'augmenter, afin de tendre vers un effectif de populations viables de 1500 individus (seuil où la population se maintient sans renforcement). Les axes 1 et 3 de ce PNA ont pour objectif d'améliorer la connaissance de la biologie et du comportement de l'espèce et de renforcer leur population par réintroduction d'animaux d'élevage. De plus, un projet Life + Alister vient également de débiter (2013-2018) et a, entre autres, pour objectifs de limiter la mortalité due à la prédation et d'améliorer les connaissances quant à la perception de cette prédation chez le Grand hamster (i.e. perception olfactive, visuelle...).

Le but de cette étude est dans un premier temps d'évaluer le tempérament des hamsters d'élevages prévus pour la réintroduction, afin de pouvoir corréliser par la suite les profils tempéramentaux relevés avec la survie et le succès reproducteur des individus relâchés. Dans un second temps de tester leur capacité à percevoir des prédateurs, à évaluer leur réaction (approche ou évitement) et de les corréliser avec leur survie en milieu naturel. Au total, 520 hamsters seront utilisés sur une période de 5 ans.

Cette étude ne pouvant être réalisée sur une autre espèce que le Grand Hamster, il n'a pas été possible de la remplacer comme préconisé par la règle des 3 R. Toutefois, l'effectif des individus testés a été réduit à son minimum pour nous permettre d'évaluer le profil tempéramental de notre élevage. De plus, des alternatives de raffinement ont été mises en place (enrichissement de la cage, manipulation limitant le stress...) afin d'améliorer le bien-être des animaux utilisés dans le cadre de cette expérimentation.

3733. La maladie de Parkinson est une atteinte neurologique chronique qui touche près de 6,3 millions de personnes dans le monde. Sa prévalence dans les pays occidentaux augmente avec l'âge. Les complications de la pathologie conduisent à une augmentation de la mortalité, et à une baisse de la qualité de vie. Le caractère chronique de la pathologie conduit à de forts coûts de santé, pendant une longue durée. Les thérapeutiques actuelles, dont la stimulation cérébrale profonde, permettent d'atténuer les symptômes, mais ne permettent pas d'arrêter ni de ralentir le développement de la pathologie. En conséquences, la neuroprotection dans la maladie de Parkinson est une piste importante de recherche, afin d'arrêter ou de ralentir la dégénérescence des neurones dopaminergiques.

Le diagnostic de la maladie de Parkinson à un stade précoce est difficile car les premiers signes moteurs interviennent lorsque 50 à 70% des neurones concernés ont dégénéré. C'est pourquoi une stratégie neuroprotectrice doit présenter des risques très limités car elle s'appliquerait à des patients présentant peu ou pas de déficiences motrices. Des études préliminaires ont démontré l'effet neuroprotecteur de l'illumination proche infra-rouge (NIR) sur des cultures cellulaires ainsi que sur des souris traitées au MPTP (neurotoxine induisant la mort des neurones dopaminergiques et donc conduisant au développement chez l'animal de symptômes similaires à ceux de la maladie de Parkinson).

L'objectif du projet est de développer, sur cette base, une nouvelle thérapeutique chirurgicale de la maladie de Parkinson, moins invasive que la stimulation cérébrale profonde, via la mise en place d'une fibre optique endoventriculaire, chroniquement implantée et permettant une illumination NIR à action neuroprotectrice. La présente étude vise à préfigurer le développement d'un implant humain chez le macaque fascicularis. Le modèle de primates non humain est le plus à même de préparer un essai clinique, du fait de sa proximité anatomique et physiologique avec l'Homme. Des primates (n=33) seront traités avec la neurotoxine MPTP (afin d'induire les symptômes de la maladie de Parkinson) en aigu ou en chronique, et seront ou non traités avec une illumination NIR. Un groupe d'animaux (n=8) sera réservé pour évaluer la biocompatibilité de l'implant et l'innocuité de l'illumination NIR à long terme.

Dans nos travaux de R&D, le recours à l'expérimentation animale est un pré-requis nécessaire pour :

- Evaluer l'efficacité d'une illumination NIR à visée neuroprotectrice dans la maladie de Parkinson.
- Mettre au point la technique chirurgicale et le prototype d'implant en vue d'un essai clinique chez l'Homme.
- Estimer le degré de sécurité biologique du dispositif médical implantable et de l'approche chirurgicale.

3734. *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène bien connu dans la mucoviscidose. L'éradication de la bactérie est un élément-clé dans la prise en charge thérapeutique du patient au stade de la primo-colonisation pulmonaire. Elle repose notamment sur l'utilisation d'antibiotiques comme la colistine. Bien que la colistine possède une bonne activité in vitro, son effet est nettement diminué au stade de colonisation chronique. Grâce à des souches bactériennes modifiées, nous tentons de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation de *P. aeruginosa* à la colistine dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris sauvage et CFTR-/-.

Nous prévoyons d'utiliser 144 souris sur 1 an, dans une procédure de sévérité modérée. Les souris sont généralement utilisées dans les expériences d'infection puisque ce sont des modèles classiques, fiables, facilement utilisables, avec un matériel d'imagerie adapté au petit animal. De plus, il n'existe pas d'autre modèle représentatif de la pathologie étudiée (mucoviscidose) en dehors du modèle murin CFTR KO.

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension des mécanismes développés par ce pathogène en réponse à la colistine. Ceci devrait aboutir à l'identification de nouvelles cibles moléculaires pour le développement d'inhibiteurs spécifiques, qui associés à la colistine devraient permettre une augmentation de son effet bactéricide.

Ce projet occasionnera des effets néfastes chez les souris infectées dont l'infection ne sera ni contrôlée par le système immunitaire de la souris, ni par le traitement par colistine. L'expérience consiste à infecter par voie intra-trachéale les poumons des souris avec une souche bactérienne bioluminescente (PAO1 délétée de l'opéron *arn*) puis de leur administrer l'antibiotique sous forme d'aérosol. La numération bactérienne sera appréciée quantitativement au cours du temps par la mesure de la luminescence émise par les bactéries vivantes. Ainsi, les souris pour lesquelles l'infection va diffuser dans le poumon seront en situation de douleur modérée. Compte tenu que les anti-inflammatoires influent sur la réponse à l'infection, ceux-ci ne peuvent pas être envisagés. Toutefois, pour éviter une trop grande souffrance des souris, les animaux seront mis à mort dès que la quantité de bactéries intrapulmonaires atteint le seuil au-delà duquel l'infection ne pourra plus être contrôlée par le système immunitaire, conduisant à la mort. En effet, en dessous du seuil, l'évolution de l'infection vers une diffusion ou une élimination des bactéries par le système immunitaire est imprévisible. Dans la littérature, la résistance adaptative à la colistine a été étudiée principalement *in vitro* dans des expériences de bactéricidie mettant uniquement en jeu le couple bactérie-antibiotique. La communauté scientifique n'a pas encore évalué l'effet adaptatif de la colistine dans des modèles *in vivo*. Le recours à l'animal apportera des connaissances plus proches de la réalité clinique rencontrée chez les patients. Contrairement aux études *in vitro*, le comportement de la souche bactérienne sera étudié dans un contexte global prenant en compte la réponse immunitaire de l'hôte ou encore la cinétique d'élimination de la colistine.

Le nombre d'animaux a été considérablement réduit par rapport aux techniques classiques de dénombrement grâce à l'utilisation de souches bactériennes luminescentes couplé à un système d'imagerie. En effet, il permet de quantifier les bactéries bioluminescentes sans sacrifier les souris. De plus le nombre d'animaux utilisés a été évalué pour répondre aux besoins des tests statistiques.

3735. Le projet vise à tester des composés potentiellement actifs *in vivo* pour le traitement des maladies métaboliques et de leurs complications sur des modèles animaux normaux ou physiopathologiques. Les modèles physiopathologiques sont obtenus par induction alimentaire, chimique ou chirurgicale (cf. projet « Obtention de modèles animaux induits pour l'évaluation de l'effet de composés potentiellement actifs *in vivo* dans le traitement des maladies métaboliques et de leurs complications ») ou par l'intermédiaire de centres d'élevage agréés.

Les techniques employées dans ce projet sont des techniques employées chez l'homme (par exemple : cinétique d'effet, hyperglycémie provoquée, clamp hyperinsulinémique). Elles ont pour finalité des dosages plasmatiques à partir de prélèvements sanguins effectués au cours et en fin d'étude et des dosages tissulaires à partir de prélèvements des organes cibles (par exemple foie et pancréas) effectués en fin d'étude.

Le nombre total d'animaux nécessaire à la réalisation du projet est estimé à 10000 rats / souris confondus. Afin de limiter l'utilisation de ces animaux (remplacement et réduction), les seuls composés testés dans ce projet sont ceux ayant montré au préalable des effets positifs dans des tests *in vitro* (screening). Tous les animaux du projet font l'objet (raffinement) d'un enrichissement systématique et de conditions d'hébergement conformes à la directive 2010/63/UE, d'une période d'habituation par la manipulation avant l'expérience afin de limiter le stress, d'un protocole d'atténuation de la souffrance par l'administration d'anesthésique quand nécessaire et d'un suivi systématique des critères d'interruption (points d'arrêt anticipés)

3736. Cette autorisation est demandée en vue d'utiliser des animaux, plus spécialement des souris Balb/c qui servent pour la production d'anticorps monoclonaux (immunisation et production d'ascite) à visée diagnostique ou thérapeutique.

Les anticorps monoclonaux sont utilisés pour établir un diagnostic dans le domaine de la recherche scientifique et en thérapie. Ce sont des substances immunobiologiques qui réagissent de façon hautement spécifique avec certaines structures cellulaires. Ils sont utilisés en immunologie, virologie et biochimie ainsi que dans d'autres domaines de recherche. De nombreux tests de diagnostic modernes sont basés sur ces techniques (ELISA, ELISpot). Les anticorps monoclonaux ont permis d'avancer dans certains domaines de la recherche médicale, notamment en cancérologie avec la destruction sélective des cellules cancéreuses, le dépistage précoce du cancer et d'autres maladies ainsi que la possibilité de produire des immunoglobulines (sérum spécifique) à des fins thérapeutiques. Des milliers d'anticorps monoclonaux différents (dont beaucoup sont conjugués) sont proposés par diverses firmes, surtout aux USA, en Grande-Bretagne et en Hollande. En outre, de nombreux groupes de chercheurs développent leurs propres anticorps monoclonaux pour l'élucidation de questions spécifiques.

La production d'anticorps monoclonaux se déroule en plusieurs étapes :

- l'immunisation de la souris contre un antigène,
- son euthanasie
- la récolte des lymphocytes B sécrétant les anticorps et leur fusion avec un myélome pour les rendre immortels,
- la culture de ces cellules dans un milieu adapté pour qu'elles secrètent l'anticorps recherché. Une des méthodes est de les injecter dans la cavité abdominale des souris où elles forment des masses tumorales et de ponctionner ensuite le liquide d'ascite qui renferme les anticorps.

Pour la phase d'immunisation nous avons besoin de 160 souris /an soit 800 sur 5 ans.

Pour les macrophages : 800 souris /an, soit 4000 sur 5 ans.

Pour la production en ascite : 500 souris /an, soit 2500 sur 5 ans.

Au total : 1460 souris /an, soit 7300 sur 5 ans.

Règle des 3R :

- aucune des techniques actuelles ne permet de remplacer la souris pendant la phase d'immunisation.
- pour les macrophages : leur remplacement est à l'étude pour ce qui concerne leur rôle dans la sécrétion de facteurs de croissance. Cela pourra être utilisé lors des clonages. Par contre nous n'avons pas de solution pour remplacer leur rôle dans la phagocytose des débris cellulaires présents dans les plaques de fusion et ils devront toujours être utilisés.
- pour les ascites : des méthodes alternatives permettent maintenant de cultiver les cellules *in vitro*, et notre partenariat avec une société qui a une unité de production *in vitro*, nous donne accès à ces techniques à un coût équivalent aux productions en ascites. Nous prévoyons une décroissance régulière du nombre de productions par la méthode de l'ascite, d'ici 3 ans elle ne sera plus utilisée sauf rare exception. L'expérience acquise depuis 28 ans nous permet d'optimiser le nombre de souris nécessaires. L'utilisation d'analgésiques et le respect des points limites nous aident à réduire la douleur infligée.

3737. Ce projet vise à étudier le rôle de certains récepteurs de signalisation dans la régulation de la pression artérielle et de la fonction cardiaque

De nombreux articles ont montré que les récepteurs répondant aux protéases et aux lipides modulent la contractilité vasculaire et la fonction des cardiomyocytes. Cependant leurs rôles *in vivo* restent à définir.

L'objectif de ce projet est de déterminer et de comprendre le rôle des protéases et des lipides chez des souris déficientes en lipides et ou en protéases dans le maintien de la pression artérielle et de la fonction cardiaque.

La mesure de pression artérielle se fera :

- chez des animaux anesthésiés pour des réactions à court terme (de 0 à 60 min) selon les agents pharmacologiques utilisés.

- par l'utilisation de capteurs de télémétrie chez des animaux vigiles et non restraints, pour des mesures en continue de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque allant d'1 journée à 14 jours d'enregistrements.

Ce projet nécessite 320 souris mâles, il a été élaboré en accord avec la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner)

La réduction du nombre d'animaux a été réalisée tout en permettant au projet d'obtenir le nombre suffisant de données pour répondre à la problématique.

Concernant le raffinement, l'utilisation de la télémétrie, des pompes osmotiques, des conditions de soins (produits analgésiques et anesthésiques), ainsi que le suivi et la prévention du bien être des animaux ont été pris en compte dans ce projet.

La procédure d'euthanasie des animaux en fin d'expérimentation est une procédure standard, réalisée dans le respect de l'éthique animal.

3738. Le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme et seconde femme.. Un des moyens des moyens de lutter contre le développement de la tumeur est d'empêcher l'apport des nutriments et l'oxygène aux cellules tumorales notamment en les vaisseaux sanguins existants ou empêchant leur formation. Les cellules formant ces vaisseaux sanguins expriment une protéine, le récepteur de la FSH (FSHR); un inhibiteur de la cascade d'activation de cette protéine est disponible.

Notre objectif est d'évaluer l'efficacité de cet inhibiteur sur le développement tumoral. Cette étude nécessite l'utilisation des animaux car l'effet de l'environnement (ici les vaisseaux) sur la croissance tumorale ne peut être étudié sur les cellules isolées.

L'efficacité de cette molécule sera évaluée sur des modèles de xénogreffes de cancer du sein, de colon et de l'ovaire, qui sont parmi les cancers les plus fréquents et que les traitements anticancéreux utilisés aujourd'hui ne montrent pas ou peu d'efficacité dans les stades avancés de la maladie.

Ces modèles sont obtenus à partir des fragments de tumeurs de patients implantés directement sur les souris dont leur système immunitaire est déficient, afin de favoriser le développement de xénogreffes de tumeurs. Ces xénogreffes sont actuellement le modèle tumoral le plus proche des tumeurs des patients.

Pour tester l'efficacité de cette molécule pour les 3 modèles de xénogreffes, le nombre total de souris nécessaire est de 360 souris. Ce nombre est réduit à son strict minimum nécessaire et tient compte d'une part du taux de prise tumoral (67%) sur les animaux et d'autre part pour pouvoir évaluer de façon statistique robuste l'effet des médicaments il faut minimum 10 souris portant une tumeur par groupe. En tenant compte de ces 2 paramètres, il faut greffer 15 souris par groupe.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et n'induisent pas de modification de leur comportement. Les greffes de la tumeur se font sous l'anesthésie générale. Les animaux sont surveillés quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales en cancérologie, sont observés pour ceux-ci tout au long des expériences.

3739. L'insulinorésistance (IR) se définit comme une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, qui a pour conséquence une incapacité de l'insuline à réguler les métabolismes glucidique et lipidique. De nombreuses pathologies sont associées à des anomalies du métabolisme du glucose ou à des perturbations de son transport, comme par exemple le Diabète de type 2 ou encore les ischémies myocardique ou cérébrale. La prévalence du diabète est en nette augmentation dans les pays industrialisés et les nombreuses complications qui lui sont associées en font un véritable problème de santé publique.

Le stade pré-diabétique est caractérisé par un état d'insulinorésistance (IR), c'est-à-dire un défaut de transport du glucose dans les organes insulino-sensibles, tels que le cœur, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. La détection précoce de cet état permettrait une meilleure prise en charge des patients mais aussi un meilleur suivi de leur état métabolique.

C'est dans cette optique qu'a été développé le 6-déoxy-6-iodo-D-glucose (6DIG), un radiotracer marqué à l'iode 123, validé comme traceur pur du transport du glucose *in vitro* et *in vivo*. Par un protocole d'imagerie TEMP (Tomographie par Emission MonoPhotonique ou SPECT en anglais) simple, il permet d'évaluer la sensibilité à l'insuline chez le rat. Le 6-DIG permet ainsi de mesurer des variations pathologiques du transport du glucose par l'acquisition d'images scintigraphiques (TEMP) en Médecine Nucléaire. Par ailleurs, une étude de phase clinique I-IIa avec ce traceur est actuellement en cours au sein d'une clinique de Médecine Nucléaire. Toutefois, cette technique prometteuse présente à ce jour certaines limitations car elle nécessite la réalisation de prélèvements sanguins pendant l'acquisition des images, les mesures de radioactivité sanguine étant indispensables à l'utilisation du modèle mathématique qui permettra de calculer un index d'IR.

Il est nécessaire d'optimiser ces protocoles pour obtenir une méthode de mesure simultanée de l'IR cardiaque et musculaire non invasive et reproductible. Dans cette étude nous testerons la méthode de mesure de l'IR grâce au 6DIG sur des rats sains (Wistar) et sur des rats insulinorésistants (Zucker), puis nous testerons la reproductibilité et la sensibilité de la méthode en mesurant l'IR avant et après traitement de rats insulinorésistants par un agent thérapeutique.

Dans un deuxième temps, des études de faisabilité chez la souris sont envisagées. En effet le transfert de la méthode chez la souris pourrait permettre de réduire les temps d'acquisition (grâce au métabolisme plus rapide de la souris par rapport au rat). De plus, cela donnerait accès à des modèles pathologiques beaucoup plus variés.

Ce nouveau protocole permettrait alors le suivi dans le temps de l'évolution de l'IR chez le petit animal, en réponse par exemple à une médication. Cette méthodologie pourra alors activement participer à la mise au point et à l'évaluation de l'efficacité des traitements dans ce domaine.

Au total 80 animaux seront utilisés (30 rats Wistar, 30 rats Zucker et 20 souris CD1). Ces animaux seront hébergés par groupe, en cages avec enrichissement du milieu de vie. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié aux injections selon les bonnes pratiques vétérinaires.

3740. Nous étudions la physiologie de l'épithélium intestinal dans un contexte développemental, physiologique et pathologique. Plus particulièrement nous nous intéressons aux cellules souches de ce tissu, car il émerge depuis plusieurs années, que la transformation de ces cellules est responsable de l'initiation et de la progression des tumeurs intestinales.

Animaux

Nous utilisons la souris (*Mus musculus*) dans des fonds génétiques sauvages ou génétiquement modifiées, comme animal modèle pour des études fondamentales et des études à fins translationnelles liées au développement cancéreux. Dans ce dernier cas, le but est de reproduire chez l'animal des pathologies humaines pour des études fines.

L'ensemble du projet prévoit l'emploi de 811 souris (génétiquement modifiées et sauvages des respectifs fonds génétiques), sur une durée de cinq ans. Les animaux seront utilisés pour les approches de physiopathologie intégrative de l'intestin *in vivo* ou pour des études cellulaires et moléculaires *ex vivo*.

Spécifiquement:

o Pour les analyses *in vivo*, un nombre moyen de 4 souris par groupe expérimentale dans chaque protocole résulte approprié pour acquérir des résultats statistiquement significatifs, tout en limitant un nombre excessif d'animaux.

o En parallèle, des études visant à dévoiler des mécanismes moléculaires approfondies, sont menées sur des modèles *ex-vivo* de cultures primaires, permettant l'obtention de résultats détaillés à partir d'un nombre très limité d'animaux.

Application de la démarche 3R de l'expérimentation animale.

Notre projet prend en compte les recommandations du législateur concernant l'application de la démarche 3R.

Réduire: comme détaillé dans le Tableau 1 qui résume toutes les procédures expérimentales ainsi que le nombre d'animaux, nous proposons l'utilisation des mêmes animaux dans différentes procédures. Cela permet de réduire de manière considérable le nombre total d'animaux pour l'ensemble du projet.

Raffiner: nous avons indiqué pour chaque procédure expérimentale les démarches pour éviter la souffrance de l'animal et le point limite auquel nous prendrons des décisions éventuelles de modifier ou d'interrompre l'expérimentation.

Remplacer: notre projet prévoit l'utilisation de cultures primaires pour des études mécanistiques. En plus de mieux compléter nos études, cela nous permettra de réduire le nombre d'animaux pour l'expérimentation.

3741. Les états de choc sont la principale cause de décès des patients de réanimation. Ils sont à l'origine d'atteintes des gros et des petits vaisseaux responsables d'un mauvais fonctionnement des organes. Mieux comprendre les facteurs influençant ce mauvais fonctionnement des organes pourrait modifier le pronostic des patients. Le remplissage vasculaire (RV) qui consiste à donner des liquides au malade par les veines est le principal traitement utilisé pour traiter ces atteintes des gros et des petits vaisseaux.

Nos travaux précédents se sont portés sur l'évaluation de l'efficacité de différents liquides de RV pour traiter les états de choc sur un modèle de choc hémorragique contrôlé chez le porcelet anesthésié et ventilé mécaniquement. Nous avons étudié les facteurs pouvant modifier l'efficacité de ces liquides : vitesse d'administration des liquides, l'ajout de médicaments resserrant les vaisseaux. Notre projet d'étude se porte maintenant sur l'interaction de ces liquides de RV sur l'atteinte du tapis recouvrant l'intérieur des vaisseaux chez des animaux de sexe féminin. L'inflammation importante constatée dans les états de choc (due à une infection ou un saignement) est à l'origine d'une augmentation de la porosité des vaisseaux qui semble différente chez la femme comparée à l'homme. Les liquides donnés au malade par les veines vont fuir en dehors des vaisseaux et perdre leur efficacité. Le but de ce projet est donc de comparer l'efficacité des liquides donnés par les veines dans des situations de porosité différentes des vaisseaux comme l'infection, le saignement en les comparant à l'animal de sexe féminin et celui de sexe masculin. Des prélèvements de sang vont permettre de rechercher des molécules qui se sont détachés de l'intérieur des vaisseaux à cause de l'infection ou du saignement. Nous étudierons si le type de liquide donné par les veines va modifier le taux de molécules présentes dans le sang. Dans un second temps, des traitements supplémentaires connus pour jouer sur l'intérieur des vaisseaux et sur la porosité de ces vaisseaux seront testés. L'évaluation de la porosité des vaisseaux se fera dans différents tissus (rein, foie et poumon) à l'aide de technique de pesée et de microscopie confocale. Ce matériel est à l'heure actuelle utilisée en recherche uniquement et notre projet vise à évaluer cette technique de microscopie afin de pouvoir l'utiliser chez l'humain.

En prenant l'hypothèse que les liquides utilisés (ringer lactate et hydroxyethyl amidon) ont une différence d'efficacité de 1 pour 4, en prenant une puissance de 80% et un risque alpha de 0,05, des groupes de 12 porcelets étaient nécessaires pour monter cette différence. L'ensemble des analyses statistiques sont effectuées par un médecin statisticien agréé. En sachant que cinq expérimentations comparant les liquides 2 à 2 sont envisagées avec 3 groupes de 12 porcelets pour chaque procédure, en tenant compte de 10% de décès dus à un état de choc incontrôlable, nous envisageons d'utiliser 200 animaux sur 5 ans. Un lot d'animaux comprend 12 animaux qui vont subir un choc par infection ou par saignement et qui vont recevoir un type de liquide par les veines. Un lot de 12 animaux pour chaque expérimentation constituera le group sham. Les animaux de ce projet permettent en parallèle de former les médecins réanimateurs à la réalisation de gestes indispensables à leur pratique professionnelle. L'acquisition de ces compétences est requise pour la validation de leur formation. La règle des 3R sera respectée en utilisant des analyses statistiques en se basant sur les résultats obtenus par chaque expérimentation pour calculer le nombre d'animal nécessaire le plus faible possible. Un même animal va permettre de tester notre hypothèse sur l'efficacité des liquides utilisés, de valider une nouvelle technique de microscopie et va permettre de former un médecin à des gestes qu'il doit maîtriser sur l'homme pour le soigner au mieux. L'ensemble de l'expérimentation est réalisé sur un animal endormi par des médecins anesthésistes formé à l'évaluation de la profondeur de l'endormissement et de la douleur.

3742. La cystite est une inflammation aiguë ou chronique urinaire localisée au niveau de la vessie, le plus souvent en relation avec une infection des urines. Dans 90 % des cas, elle est d'origine bactérienne, due à une bactérie appelée *Escherichia coli*, mais d'autres bactéries ou micro-organismes peuvent en être la cause. Cette infection survient quand cette bactérie, présente naturellement dans le tube digestif, pénètre dans l'urètre, puis remonte dans la vessie, et commence à se multiplier. La cystite peut aussi être due à un agent toxique, le cyclophosphamide notamment (anticancéreux) dont l'élimination rénale de ses métabolites secondaires induit une toxicité vésicale, ou consécutive à une radiothérapie (irradiation du bassin).

La cystite touche une femme sur deux environ au cours de sa vie et intervient souvent plusieurs fois : près de 2 millions de femmes présentent en France des épisodes de cystites à répétition. Ces épisodes de cystite sont relativement bénins sauf quand ils se manifestent plus de 2 à 3 fois par an, affectent une femme enceinte ou s'accompagnent de fièvre et de douleurs intenses pouvant témoigner de complications. Les femmes, pour des raisons anatomiques, sont plus souvent concernées par cette pathologie que les hommes (50 fois plus fréquemment): l'urètre qui permet l'écoulement de l'urine vers l'extérieur est de taille réduite et son orifice est très proche de l'anus et du vagin où demeure, même en dehors de toute infection, un nombre important de bactéries.

Lorsque ces bactéries remontent dans la vessie, elles sont à l'origine d'une infection de l'urine et d'une inflammation de la paroi vésicale: c'est la cystite aiguë microbienne. Le début des symptômes survient généralement brutalement. Une envie fréquente d'uriner, la nuit comme le jour, se limitant parfois à quelques gouttes (pollakiurie). Elle se manifeste par des douleurs localisées au-dessus du pubis, des brûlures mictionnelles survenant au moment d'uriner, une présence occasionnelle de sang dans les urines (hématurie). L'urine est souvent trouble et dégage une odeur désagréable.

Toute cystite doit être traitée par des antibiotiques, seul ou en association avec un anti-inflammatoire et un antispasmodique, car elle peut se compliquer et atteindre le rein (pyélonéphrite). Cependant des produits naturels peuvent aider à lutter contre les infections urinaires. Ainsi de nombreuses études ont montré le rôle de la canneberge (cranberry), dans le traitement et la prévention des infections urinaires.

Notre projet a pour objectif de développer un modèle de cystite d'origine bactérienne chez le rat femelle correspondant à l'origine la plus fréquente de cette pathologie chez la femme. Une suspension bactérienne sera instillée dans la vessie par les voies naturelles, avec ou sans lésion superficielle localisée de l'épithélium vésical. Un suivi de paramètres physiologiques et comportementaux sera effectué. Le modèle développé aura pour finalité de tester des candidats-médicaments et composés naturels pour le traitement de la cystite.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, le projet portera sur 36 rats femelles Sprague-Dawley adultes issus d'une expérimentation précédente répartis en 6 groupes expérimentaux afin d'obtenir un nombre réduit de rats par groupe mais suffisant pour l'analyse statistique des données recueillies (raffinement). Ce modèle spécifique et les évaluations comportementales effectuées sur animaux vigiles ne peuvent pas être remplacés par des méthodes alternatives.

3743. Il a longtemps été considéré qu'une lésion cérébrale chez les mammifères adulte est irréversible. Aujourd'hui on sait que la régénération du système nerveux central est possible à condition de fournir un environnement supportant la plasticité cérébrale, c'est-à-dire qui promeut notamment la croissance axonale. De nouvelles pistes thérapeutiques sont actuellement émergentes dans le domaine des nanoparticules et plus précisément pour des prothèses en matériaux semi-conducteur.

En effet, ces prothèses peuvent être recouvertes d'une couche de matériau nanométrique permettant des interactions importantes avec le tissu cérébral telles que le guidage de la croissance axonale, l'enregistrement de l'activité neuronale ou la stimulation neuronale. Les applications possibles seraient notamment la régénération du tissu cérébral et la réalisation d'une interface homme-machine (par exemple la stimulation des nerfs optiques à partir des informations provenant d'une caméra chez des patients aveugles ou l'enregistrement de l'activité électrique des neurones moteurs spinaux pour la transmettre à des membres artificiels). Toutefois, les effets pro-inflammatoires et les troubles locomoteurs potentiels des nano-prothèses créées doivent être évalués avant la réalisation de tests in vivo fonctionnels.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets pro-inflammatoires et troubles locomoteurs potentiels d'un nouveau type de nano-prothèse cérébrale lorsqu'elle est placée au niveau du cortex moteur chez le rat. Pour cela, une procédure chirurgicale sera spécifiquement développée pour la mise en place intracrânienne de la nanoprothèse. A l'issue de la chirurgie, la face de la prothèse couverte de nanoparticules sera mise en contact direct avec le cortex moteur des animaux. Dans un 2ème temps, l'évaluation des effets de la nano-prothèse sur l'inflammation et les troubles locomoteurs sera réalisée. Un groupe de rats opéré de manière identique avec mise en place d'une prothèse connue pour ses effets pro-inflammatoires servira de contrôle positif à l'étude.

Une série de tests in vitro réalisée précédemment n'a pas montré d'effet toxique de ces nano-prothèses. Toutefois, la portée de ce type de tests est très limitée car ils ne reproduisent pas les conditions d'un organisme entier et ne peuvent se substituer à la réalisation de tests in vivo (Remplacement). Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum (Réduction) permettant une interprétation scientifique des résultats (Raffinement).

Pour ce projet, 3 rats mâles Wistar d'un poids de 300 g serviront à la validation de la procédure chirurgicale. Dans un deuxième temps, 15 rats mâles Wistar d'un poids de 300 g serviront à l'étude des propriétés pro-inflammatoires potentielles des nanoprothèses.

Les animaux seront suivis sur une durée maximum de 13 semaines (90 jours). Au cours de cette période, leurs performances locomotrices seront évaluées toutes les 4 semaines dans un test d'activité locomotrice et un test de coordination locomotrice.

A l'issue de chaque série de tests, une décision de Go-No Go sera prise: en cas d'observation d'un effet délétère des nanoprothèses testées sur les performances locomotrices, les animaux seront euthanasiés. Si aucun effet délétère n'est observé, l'étude se poursuivra jusqu'à son terme (90 jours). Les résultats de cette étude fourniront des données utiles à la décision de poursuivre ou non le développement de ces nano-prothèses.

3744. Le syndrome d'Usher est la cause la plus fréquente de trouble sensoriel héréditaire associant une profonde surdité à une cécité grave. La cécité est due à une dégénérescence rétinienne qui sous-tend une rétinite pigmentaire. Sa prévalence est estimée entre 1 sur 10000 et 1 sur 25000 individus.

Il existe 3 sous types cliniques de ce syndrome considérant les gènes impliqués et la sévérité des symptômes. Les mécanismes moléculaires à l'origine de la surdité sont bien compris aujourd'hui mais les causes précises de la cécité ne sont pas connues et les mécanismes peu décryptés. Des nouveaux modèles animaux du syndrome d'Usher ont récemment été générés pour étudier la physiopathologie de la maladie et développer la thérapie génique.

Pour trouver de nouveaux traitements et mieux appréhender la physiopathologie de cette maladie, nous devons comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces symptômes. L'étude de modèles murins déficients pour ce gène nous permettra de mieux comprendre l'impact de l'absence de cette protéine dans le développement de la maladie. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sur 5 ans sera de 1285 souris par souche génétique soit 2570 souris ; ce qui est le minimum requis pour tenir compte à la fois de la règle des 3R et des statistiques.

Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les pools d'animaux contrôles.

3745. L'objectif de cette étude est de mieux comprendre la mise en place des pathologies liées à un mauvais dosage du gène *Mecp2*. En effet, ce gène est extrêmement important pour la mise en place et le bon fonctionnement du cerveau. Actuellement il existe des patients présentant soit des mutations soit des duplications de ce gène. Dans tous les cas, ces modifications géniques conduisent à une déficience intellectuelle sévère associée à des déficits moteurs et conduisent souvent à un décès prématuré. En cumulé, on estime qu'il naît environ 30 000 cas par an dans le monde de patients présentant un mauvais dosage du gène *Mecp2*. Notre projet s'appuie sur l'étude comportementale, moléculaire et cellulaire de souris modèles. Plus particulièrement, nous allons nous intéresser au développement de traitements (pharmacologiques ou thérapie génique) in vivo chez l'animal modèle afin d'améliorer les déficits comportementaux.

Toutes les molécules pharmacologiques testées vont être, soit placées dans l'eau de boisson si la molécule est soluble et stable, soit injectée en intrapéritonéal, afin que le mode d'administration soit directement transférable chez l'homme. En fonction de leur biodisponibilité les

agents pharmacologiques seront donnés soit dans l'eau de boisson soit par injection (ip). Le traitement dans l'eau de boisson s'effectuera de manière quotidienne à partir de l'apparition des premiers symptômes. Le traitement par injection s'effectuera tous les 3 jours par injection intrapéritonéale également à partir de l'apparition des premiers symptômes. Enfin le traitement par thérapie génique sera réalisé en une seule fois toujours après apparition des premiers symptômes. Ainsi, les capacités motrices, respiratoires et cognitives chez nos souris modèles vont être évaluées avec ou sans traitement en utilisant des tests non invasifs, et non douloureux.

Ces mêmes tests seront réalisés tous les dix jours afin d'évaluer la progression de la pathologie et évaluer si les traitements présentent une efficacité durable. Dans un deuxième temps nous allons évaluer l'impact moléculaire et cellulaire de ces mêmes traitements en sacrifiant des souris. Pour réaliser ce projet nous allons avoir besoin d'un total de 480 souris maximum. En effet, afin de réduire le nombre de souris utilisées nous allons conduire des expérimentations préliminaires de traitement avec des nombres réduits d'animaux. A l'issue de ce travail, nous évaluerons statistiquement de la pertinence d'une augmentation du nombre d'animaux.

Afin d'obtenir les souris nécessaires au projet nous croiserons nos souris modèles afin d'obtenir suffisamment d'animaux. Nous allons tout mettre en œuvre afin d'éviter l'isolement mais aussi la surpopulation des souris. Les cages seront enrichies par des dômes en carton. La nourriture et l'eau seront vérifiées tous les jours et le remplissage des biberons et des granules se fera 2 fois par semaine. Les conditions de l'animalerie sont surveillées (température, hygrométrie, d'humidité et éclairage artificiel). L'état sanitaire des souris est classiquement contrôlé deux fois par an dans notre animalerie.

Lors de nos procédures nous allons mettre en place tout ce qui est nécessaire afin limiter la souffrance et la douleur. En effet bien que tous les tests, d'analyse du phénotype, soient non invasifs et non contraignants, nos souris modèles meurent prématurément vers le deuxième mois. Nous allons donc suivre l'évolution de nos animaux jour après jour afin d'évaluer des signes de souffrance et une perte de poids de plus de 20% sera jugée comme le point limite entraînant l'euthanasie des animaux.

3746. Le syndrome HANAC est une angiopathie héréditaire associée à une néphropathie, des anévrismes et des crampes musculaires. Celui ci est transmis de façon autosomal dominant, ce qui signifie qu'une seule copie du gène altéré est suffisante pour causer la maladie. Les patients atteints du syndrome HANAC sont également sujet à des troubles visuels tels que des tortuosités artérielles responsable d'hémorragies rétinienne. Il a été montré qu'une mutation dans le gène du collagène 4 est responsable de ces symptômes. En effet, ce gène code pour un sous type de protéine localisée principalement dans la membrane basale des vaisseaux.

Les causes précises de cette maladie ne sont pas connues et les mécanismes peu décrits. Pour trouver de nouveaux traitements et mieux appréhender la physiopathologie de cette maladie, nous devons comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous tendent ces symptômes. L'étude de modèles murins déficients pour ce gène nous permettra de mieux comprendre l'impact de l'absence de cette protéine dans le développement de la maladie. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sur 5 ans sera de 1357 souris ; ce qui est le minimum requis pour tenir compte à la fois de la règle des 3R et des statistiques.

Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les pools d'animaux contrôles.

3747. La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) est une maladie génétique causée par une expansion de triplet CTG $>$ 50 dans la région 3' non codante du gène DMPK. La DM1 est caractérisée par une myotonie, une faiblesse musculaire progressive, des troubles cardiaques ainsi que cognitifs. Les ARN DMPK mutés contenant des répétitions CUG forment des agrégats nucléaires qui séquestrent des facteurs d'épissage de la famille MBNL. La perte de fonction de MBNL conduit à des anomalies de maturation de certains ARN messagers et la réexpression d'isoformes fœtales dans un tissu adulte. Ainsi le défaut d'épissage du l'exon 7a du canal chlore muscle-spécifique et de l'exon 11 de BIN1 ont été associés à des symptômes cliniques comme la myotonie et la faiblesse musculaire chez les patients DM1. Cependant une quarantaine d'événement d'épissages alternatifs aberrants ont été décrits dans le muscle strié de patients DM1 mais leurs conséquences fonctionnelles ne sont encore connues.

Le premier objectif de ce projet est d'étudier les conséquences fonctionnelles au niveau du muscle strié de certains défauts d'épissage retrouvés chez les patients DM1. Pour cela, nous allons moduler l'épissage alternatif à l'aide de U7-snRNA modifiés de huit transcrits dont la protéine résultante est essentielle à la fonction musculaire. Ceci nous permettra d'étudier les répercussions fonctionnelles de la réexpression de protéines fœtales dans un muscle adulte.

Le second objectif vise à exprimer des expansions CTG spécifiquement dans les noyaux des différentes cellules qui composent la jonction neuromusculaire chez la souris, à l'aide de vecteurs viraux. Cette approche permettra d'une part d'identifier les épissages alternatifs spécifiquement altérés par les expansions CTG en fonction de leur expression cellulaire, et d'autre part de déterminer les conséquences sur la fonction musculaire.

En conformité avec les exigences de remplacement et la règle des 3Rs, nous avons déjà développés des modèles cellulaires in vitro pour l'étude des anomalies d'épissage alternatif retrouvé dans le DM1. Cependant l'évaluation de l'impact des altérations spécifique d'épissage alternatif ainsi que de l'expression d'expansion CTG dans les différentes cellules de la jonction neuromusculaire, sur la fonction musculaire nécessite l'utilisation d'animaux vivants car il n'y a pas d'autres méthodes expérimentales. Des conditions d'hébergement et de soins appropriés seront mises en place et une attention particulière sera portée pour réduire d'éventuelle douleur, angoisse ou souffrance. Afin de réduire et d'optimiser le nombre d'animaux, les évaluations se feront en plusieurs étapes. Ainsi la réussite de la première étape détermine la poursuite et la mise en place de la seconde étape. Au total, un maximum de six cent vingt-six souris seront inclus dans le projet.

3748. La douleur est un problème de santé publique majeur. Elle diminue la qualité de la vie et son traitement a un impact économique considérable. Bien que des progrès importants aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, peu de progrès ont été faits dans le développement de nouveaux analgésiques et l'administration d'opiacés demeure le moyen le plus efficace de traiter les douleurs moyennes à sévères. Malheureusement pour les patients, les opiacés présentent de nombreux effets secondaires, parmi lesquels le développement de la tolérance à leurs effets analgésiques pose problème, puisque l'effet du traitement diminue au cours du temps. Ce phénomène serait dû à l'activation de systèmes anti-opioïdes, induit par l'administration prolongée d'opiacés, qui conduirait au développement d'une hyperalgésie s'opposant à l'effet analgésique de l'opiacé. Les douleurs chroniques, qui répondent souvent faiblement aux opiacés, sont fréquemment associées au développement d'une hypersensibilité à la douleur. Ces observations suggèrent que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'hyperalgésie induite par les opiacés pourraient avoir des points communs avec ceux impliqués dans le développement de l'hyperalgésie induite par les douleurs chroniques. Nos résultats récents indiquent que les récepteurs à neuropeptides RF-amide sont impliqués dans ces phénomènes. Nous avons récemment généré six lignées de souris transgéniques déficientes pour chacun des six récepteurs RF-amide qui nous permettront notamment de mieux comprendre l'implication de chaque récepteur dans la modulation du signal nociceptif et le développement de l'hyperalgésie. Le phénotypage des souris des 6 lignées de KO des

récepteurs RF-amide sera réalisé dans différents modèles d'hyperalgésie induite par les opiacés et les douleurs persistantes. A terme, ces études permettront d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le traitement de la douleur

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer: L'étude du phénotype de souris KO des récepteurs RF-amide dans différents modèles d'hyperalgésie est un passage incontournable pour mieux comprendre l'implication de ces récepteurs dans la modulation de la douleur. Il n'existe pas de modèles in vitro permettant de réaliser ce travail.

Réduire: Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner: Un point limite est fixé pour chaque teste nociceptif utilisé au-delà duquel la stimulation nociceptive est arrêtée en absence d'une réaction de l'animal.

Dans le cas des modèles de douleur persistantes, les animaux sont sous observation quotidienne pour détecter les signes de détresse et de douleur inutile (perte de poids supérieure à 15%, prostration, poils hérissés, automutilation...). Dès l'apparition de ces signes, l'animal sera euthanasié.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 1560 souris

3749. La douleur est un problème de santé publique majeur. Elle diminue la qualité de la vie et son traitement a un impact économique considérable. Bien que des progrès importants aient été réalisés dans la compréhension des mécanismes de la douleur, peu de progrès ont été faits dans le développement de nouveaux analgésiques et l'administration d'opiacés demeure le moyen le plus efficace de traiter les douleurs moyennes à sévères. Malheureusement pour les patients, les opiacés présentent de nombreux effets secondaires, parmi lesquels le développement de la tolérance à leurs effets analgésiques pose problème, puisque l'effet du traitement diminue au cours du temps. Ce phénomène serait dû à l'activation de systèmes anti-opioïdes, induit par l'administration prolongée d'opiacés, qui conduirait au développement d'une hyperalgésie s'opposant à l'effet analgésique de l'opiacé. Les douleurs chroniques, qui répondent souvent faiblement aux opiacés, sont fréquemment associées au développement d'une hypersensibilité à la douleur. Ces observations suggèrent que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'hyperalgésie induite par les opiacés pourraient avoir des points communs avec ceux impliqués dans le développement de l'hyperalgésie induite par les douleurs chroniques. Nos résultats récents indiquent que les récepteurs à neuropeptides RF-amide sont impliqués dans ces phénomènes. Nous avons récemment identifié des antagonistes sélectifs des différents récepteurs RF-amide qui nous permettront notamment de mieux comprendre l'implication de chaque récepteur dans la modulation du signal nociceptif et le développement de l'hyperalgésie. L'étude de l'activité de chacun des 5 composés que nous avons identifié sera réalisé dans différents modèles d'hyperalgésie induite par les opiacés et les douleurs persistantes. A terme, ces études permettront d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour le traitement de la douleur.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer: La caractérisation d'antagonistes sélectifs des récepteurs RF-amide dans différents modèles d'hyperalgésie est un passage incontournable pour mieux comprendre l'implication de ces récepteurs dans la modulation de la douleur. Il n'existe pas de modèles in vitro permettant de réaliser ce travail. Les composés qui seront évalués ont été sélectionnés in vitro pour leur activité, leur sélectivité et leurs caractéristiques physicochimiques.

Réduire: Compte tenu de la variabilité dans les différentes expériences prévues, le nombre d'animaux est limité à 10 par groupe ce qui permet d'obtenir des résultats exploitables en termes statistiques.

Raffiner: Un point limite est fixé pour chaque teste nociceptif utilisé au-delà duquel la stimulation nociceptive est arrêtée en absence d'une réaction de l'animal.

Dans le cas des modèles de douleur persistantes, les animaux sont sous observation quotidienne pour détecter les signes de détresse et de douleur inutile (perte de poids supérieure à 15%, prostration, poils hérissés, automutilation...). Dès l'apparition de ces signes, l'animal sera euthanasié.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 1350 souris C57BL6N

3750. Ce projet a pour objectif de comprendre l'importance relative de protéines entrant dans la composition des réserves de l'œuf de poisson dans les processus biologiques déterminant la qualité des œufs de poisson (c'est à dire leur aptitude à permettre le bon développement de l'embryon). Chez le poisson zèbre, 7 gènes existent qui codent pour des vitellogénines, des protéines exprimées dans le foie, qui une fois incorporées dans l'œuf, permettront le développement du futur embryon. Certaines de ces protéines sont incorporées dans l'ovocyte au cours de sa croissance dans l'ovaire de la mère sans que l'on sache laquelle ou lesquelles de ces protéines jouent un rôle prépondérant dans la qualité de l'œuf. L'intérêt scientifique du projet réside dans le fait qu'il permettra de caractériser le rôle respectif des différentes vitellogénines, qui est pour le moment non décrit chez aucune espèce de poisson. Le projet sera focalisé sur 4 de ces 7 protéines suite à des analyses préliminaires permettant de déterminer lesquelles parmi ces 7 protéines joueraient un rôle prépondérant.

Le nombre d'animaux nécessaires au projet est de 600 poissons ce qui correspond à 150 poissons pour chacune des 4 protéines étudiées. Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative in vitro car le processus étudié, (incorporation de protéines de réserve dans l'œuf) ne peut être réalisé in vitro.

- Réduction : Le nombre d'animaux est adapté pour permettre de générer une lignée présentant l'absence de chacune des 4 protéines d'intérêt tout en disposant d'un nombre suffisant d'animaux pour réaliser les expériences.

- Raffiner : Les animaux seront anesthésiés dans les conditions réglementaires préalablement aux prélèvements de gamètes ou de génotypage.

3751. La médecine nucléaire ou imagerie moléculaire est une technique récente dite fonctionnelle car elle permet d'étudier le fonctionnement ou le métabolisme d'un organe. Elle permet également de localiser des cibles moléculaires à la surface des cellules. Pour produire une image, le médicament est couplé à une infime quantité d'éléments radioactifs qui émettent des rayonnements. L'appareil de détection, appelé caméra, produira une image à partir des rayons émis du corps entier ou de la partie du corps étudiée. En cancérologie, l'examen le plus répandu est la Tomographie par Emission de Positons (TEP) au Fluoro-désoxy-glucose (18FDG). Le glucose lié au fluor-18 a la propriété d'être capté par les tissus et de s'accumuler plus particulièrement dans les cellules tumorales qui ont une activité biologique beaucoup plus intense que les cellules saines. Cette analyse renseigne de façon très précise sur la taille de la tumeur, sur son activité ou sur la présence de métastases. Aujourd'hui de nombreuses équipes de recherche travaillent sur le développement de nouveaux

radiomédicaments. Ainsi des radioéléments différents du fluor-18 comme le gallium-68 ou le cuivre-64 sont à l'étude pour le diagnostic. Pour être employés, ces radioéléments sont transportés par une molécule porteuse par exemple un sucre (FDG), un dérivé d'une hormone ou une protéine. Ces transporteurs, aussi appelés vecteurs, se fixent sur une cible biologique particulière.

Notre équipe travaille sur le ciblage de tumeur par des radioéléments grâce à la production de vecteurs innovants. Notre projet est de fabriquer une protéine reconnaissant un antigène exprimé à la surface de nombreux types de cancer et qui portera du gallium-68. La protéine fabriquée par synthèse chimique a une structure de plateau où sont fixés quatre fois le même motif d'acides aminés. Ce motif est reconnu par notre cible et permet au vecteur de se fixer spécifiquement sur la tumeur. Afin de marquer le gallium-68 sur notre vecteur, des petites molécules appelées chélatants vont être conjuguées à la protéine. Les chélatants étudiés doivent répondre aux critères d'un bon chélatant : conjugaison simple à la protéine et marquage par le gallium-68 à température ambiante. Les vecteurs marqués par le gallium-68 seront détectés par imagerie TEP après injection.

Au total 144 souris NMRI nues, greffées avec des cellules embryonnaires humaines de reins (HEK-293) exprimant la cible de notre traceur, l'intégrine $\alpha\beta3$, seront incluses dans le protocole après réduction et optimisation de leur nombre. Ces animaux seront hébergés en cages avec enrichissement du milieu de vie. Le protocole d'imagerie qui sera mis en œuvre n'entraînera pas de douleur, souffrance ou angoisse en dehors d'un stress bref et modéré lié à l'injection intraveineuse de la molécule radiomarquée.

3752. Le traitement chimiothérapeutique administré dans le cadre d'un cancer a de nombreux effets indésirables, notamment au niveau du système digestif, et est souvent responsable d'une cachexie^{1,2}. Cela s'accompagne d'une anorexie qui majore les conséquences du traitement sur le statut nutritionnel³. Afin de limiter ces effets néfastes, les cycles de chimiothérapie sont espacés, diminuant ainsi l'effet thérapeutique sur la tumeur. La prise en charge nutritionnelle des patients sous chimiothérapie, sous forme d'une nutrition entérale continue, permettrait de prévenir les effets délétères du traitement et, par conséquent, d'effectuer un nombre optimal de cycles de chimiothérapie. De plus, parmi les différentes formules de nutrition entérale existantes, certaines pourraient s'avérer plus efficaces que d'autres pour pallier aux effets secondaires liés au traitement.

Le but du projet est donc, dans un premier temps, de définir l'intérêt d'une prise en charge nutritionnelle, via l'apport de nutrition entérale dans un modèle murin porteur d'une tumeur et recevant de la chimiothérapie. Pour cela, nous utiliserons des rats femelles Fisher 344 de 11 semaines qui se verront implanter la tumeur « Ward colon », puis qui subiront une gastrostomie permettant d'administrer une nutrition entérale, et trois cycles de chimiothérapie. Dans ce modèle, un effectif de 14 animaux par groupe est nécessaire compte tenu de l'hétérogénéité de la croissance tumorale. Les études métaboliques évaluant une prise en charge nutritionnelle ne peuvent être réalisées ni in vitro ni ex vivo, ce qui nécessite l'utilisation de ce modèle murin.

Dans un second temps, il est proposé de définir quelle formule de nutrition entérale est la plus efficace dans ce modèle. Les résultats de cette étude permettront donc de mieux appréhender la prise en charge du patient cancéreux sous traitement chimiothérapeutique. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet est de 114 rats.

3753. L'inflammation est un ensemble de réactions de l'organisme en réponse à des agressions d'origine extérieure (blessure, infection) ou intérieure (maladies auto-immunes et maladies neurodégénératives type maladie d'Alzheimer (AD), maladie de Parkinson (MP), sclérose latérale amyotrophique...).

Un nombre croissant d'études montre que l'inflammation est impliquée dans la pathogénèse des maladies neurodégénératives, dont la MP et AD, l'inflammation chronique étant particulièrement délétère pour les neurones. Les processus inflammatoires au niveau du système nerveux central dépendent en grande partie de l'activation de cellules microgliales qui sont à l'origine de la réponse immunitaire innée. L'activation incontrôlée de la microglie pourrait être toxique pour les neurones, en libérant des facteurs variés comme des cytokines inflammatoires et des espèces radicalaires oxygénées. Les cytokines pro-inflammatoires exerceraient des effets neurotoxiques, en entretenant et en amplifiant le processus inflammatoire. Les espèces radicalaires oxygénées peuvent affecter l'intégrité de certains composants des cellules neuronales environnantes et participent au processus d'activation et/ou de prolifération microgliale. En outre, les microglies activées sont aussi impliquées dans d'autres situations pathologiques comme la douleur et la dépression, ce qui indique que la microglie représente une cible potentielle pour des médicaments dans un grand nombre de maladies. Dans ce contexte inflammatoire, une stratégie thérapeutique consiste à utiliser des médicaments capables de limiter l'inflammation comme les corticoïdes ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens, particulièrement efficaces pendant la phase aiguë du processus. Dans le cas de l'inflammation associée aux maladies neurodégénératives, l'approche homéopathique pourrait s'avérer une stratégie thérapeutique intéressante.

L'objectif de ce projet est d'étudier (1) l'effet anti-inflammatoire de deux préparations homéopathiques à potentiel thérapeutique sur des cultures primaires de cellules microgliales et, (2) l'effet de la microglie traitée sur des cellules neuronales également en culture primaire. L'expérimentation animale concernera la récupération du tissu neuronal embryonnaire pour la préparation des cultures primaires de microglie, et dans un deuxième temps, pour la préparation de cultures primaires de cellules neuronales.

L'étude de la neuroinflammation ne peut pas être réalisée uniquement sur des lignées cellulaires établies en raison de leur éloignement de la réalité physiologique. Elle requiert donc l'utilisation de cellules primaires, obtenues directement à partir de prélèvements biologiques, ayant une morphologie, un comportement et une activité très proches de ce qui se passe in vivo. Notre but est d'avoir suffisamment de cellules microgliales en permanence, nous permettant de mettre en place plusieurs essais de screening sur plaques multipuits par mois.

Nous prévoyons d'utiliser 60-80 souris gestantes pour la culture de microglie, et 20-40 souris gestantes pour la culture de cellules neuronales, soit 80-120 souris gestantes pour la durée totale du projet.

La finalité de ce projet sera de déterminer si les préparations homéopathiques régulent la réponse inflammatoire et si elles sont capables de réduire l'effet inflammatoire sur des cellules neuronales, qui sont des cibles vulnérables dans un contexte physiopathologique.

3754. Dans les organismes vivants, la plupart des fonctions biologiques sont animées d'un rythme d'environ 24h. Ces variations circadiennes permettent à l'organisme de s'adapter aux variations périodiques de l'environnement (jour-nuit, alimentation...). La protéine ROR intervient dans le contrôle du profil rythmé des processus métaboliques au niveau du foie et tissu adipeux.

On observe des altérations de cette rythmicité chez certains obèses ainsi que chez les travailleurs nocturnes, ce qui modifie les conditions d'absorption des nutriments. Chez les souris, un régime riche en graisse modifie ces rythmes et accentuerait les effets délétères du seul apport calorique excessif. La souris présentant une mutation du gène ROR est naturellement mince, bien que mangeant beaucoup, et résiste à l'obésité-induite par le régime hypercalorique.

Notre objectif est d'étudier la rythmicité d'expression des gènes du métabolisme dans le foie et le tissu adipeux chez les souris ROR -/- au régime standard et hypercalorique. Ceci afin de mieux comprendre comment l'absence de ROR confère un métabolisme énergétique favorable malgré une hyperphagie et de pouvoir en faire une cible potentielle contre l'obésité.

Cette étude sera réalisée à l'aide de souris ROR -/- (n=48) et ROR +/+ (n=48) soit 96 animaux au total. Seules les études in vivo, sur animal entier, permettent de renseigner des effets de l'inactivation d'un gène sur la physiologie globale de l'animal; ROR étant exprimé dans plusieurs tissus et dans différents types cellulaires au sein de ces tissus. Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum requis pour l'interprétation des résultats (4 par points).

Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal qui reste cependant indispensable. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicole (coton, maison, etc.).

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

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

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

3755. L'objectif du projet est le développement et l'application de modèles infectieux expérimentaux dans le cadre du développement de produits de santé chez les poissons d'élevage. La mise en place de modèles infectieux chez le poisson d'élevage est une condition préalable au développement de produits de santé dans ce secteur. Notre société de recherche appliquée sous contrat (Contract Research Organisation ou CRO) a pour but de proposer des modèles infectieux pour les maladies les plus courantes des poissons d'élevage suivants : Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Poisson chat (*Pangasius hypophthalmus*), Carpe (*Cyprinus carpio*), truite (*Oncorhynchus mykiss*), Barramundi (*Lates calcarifer*). Aujourd'hui en France, aucun modèle infectieux n'existe pour les principales maladies des espèces de poissons élevés dans les eaux dites « chaudes ». Les maladies concernées seront des bactérioses dues aux *Streptococcus* spp, *Edwardsiella* spp, *Flavobacterium* spp, *Aeromonas* spp, *Yersinia* spp, *Francisella* spp, Big Belly, et des viroses dues aux Iridovirus, VNN, KHV. Les modèles d'infection expérimentale visent le développement de signes cliniques de la maladie ainsi que des mortalités/morbidités finales entre 20-90% chez les poissons non traités. Des modèles d'infection par voie d'immersion et injection intra-péritonéale seront développés afin de répondre aux besoins de l'industrie. Les produits de santé testés dans nos laboratoires seront des produits de prévention de type vaccin ou additif alimentaire (levures, enzymes, pré-biotiques, probiotiques, produits végétaux ou extraits végétaux comme les huiles essentielles etc). Les modalités d'application de ces produits sont la voie orale, l'immersion ou l'injection intra-péritonéale. Le développement de produits de santé en aquaculture nécessite les étapes suivantes : développement et confirmation du modèle infectieux dans le lot d'étude, application de prototypes, évaluation d'efficacité, évaluation de toxicité, évaluation de la durée d'action etc...), nous estimons qu'un maximum de 30 000 animaux seront utilisés pendant une année pour le développement des produits de la santé dans notre établissement (capacité maximale de notre établissement).

Afin de respecter les 3 « R », nous utilisons les stratégies suivantes :

- Analyse de la variabilité dans les populations de nos fournisseurs et choix de fournisseurs proposant des animaux présentant le moins de variabilité
- Utilisation de groupes d'animaux les plus homogènes possibles
- Utilisation des statistiques pour évaluer le nombre d'animaux pertinent avant le début des expériences
- Des essais dans l'espèce cible, animaux les plus sensibles, directement nous permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés pour le développement des produits
- Rédaction d'un protocole d'étude pour chaque essai effectué ainsi qu'un rapport d'étude afin d'optimiser l'interprétation des données et éviter la répétition inutile d'essais.
- Assurer une qualité d'eau la plus constante possible afin de stabiliser l'environnement et diminuer la variabilité donc diminuer le nombre d'animaux nécessaires
- Une analyse systématique des données zootechniques de l'élevage afin de pouvoir apporter des améliorations continues
- Limitation des périodes infectieuses à 2-3 semaines maximale en développant des modèles « aigus ».
- Respecter les groupes sociaux (les animaux ne sont jamais isolés) et d'espèce (aucun mélange d'espèces différents)
- Détermination des points limites pertinents avant occurrence de la mortalité
- Du personnel compétent et formé spécifiquement à notre activité permet un suivi optimal des animaux
- Réutilisation des animaux qui ont subi une procédure de classe légère ou modérée après avis du vétérinaire sanitaire et dont l'étude précédente n'a pas d'impact sur le résultat de l'étude ultérieure.

3756. Les collectes d'ovocytes et d'embryons sont des techniques chirurgicales régulièrement employées par les scientifiques étudiant la reproduction des espèces domestiques ou sauvages que ce soit pour les expérimentations de fécondation in vitro, de transferts d'embryons, de clonage. Ces techniques visent à améliorer la productivité des troupeaux de rente ou à préserver des espèces domestiques ou sauvages en voie de disparition. La césarienne est une pratique vétérinaire courante et permet aux scientifiques d'aborder l'embryon dans les derniers jours de développement, par exemple pour des cathétérismes fœtaux.

Le nombre maximal d'animaux opérés sera de 20 brebis et de 20 chèvres.

Dans la mesure du possible, les stagiaires seront impliqués dans des protocoles chirurgicaux en cours afin de limiter le nombre d'animaux nécessaires à la formation.

Ces animaux seront hébergés dans des conditions d'élevage standard. Ils recevront les analgésiques adaptés à ce type d'intervention (anesthésies locales, générales et analgésiques post-opératoires). Si la technique est maîtrisée rapidement, nous n'utiliserons pas le nombre d'animaux escompté. Les animaux, opérés selon les règles vétérinaires en vigueur, pourront retourner dans leur élevage originel.

3757. Le cancer est une maladie qui touche l'ensemble de la population et qui est encore aujourd'hui un véritable fléau pour la société. Dans notre équipe de recherche nous nous intéressons plus particulièrement au cancer touchant les enfants. Notre travail consiste tout d'abord à comprendre les mécanismes conduisant à l'apparition du cancer afin d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans le but d'étudier ces mécanismes, nous utilisons des modèles mimant ces tumeurs. Ces modèles peuvent s'étendre de la cellule tumorale en culture jusqu'à l'utilisation de modèles animaux. Dans le cas précis de notre étude nous avons démontré que l'utilisation des cellules en culture ne permet pas l'étude de ce type de cancer et par conséquent nous empêche de découvrir des nouveaux traitements.

Cependant des modèles murins permettent de mimer parfaitement la signature de la tumeur présente chez les enfants, nous proposons donc dans ce projet l'utilisation de 2317 souris sur 5 ans. En conclusion, notre travail pourrait apporter une avancée conséquente dans le domaine du cancer du cerveau chez l'enfant. En accord avec les réglementations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

3758. Le VIP et le PACAP sont deux neuropeptides à haut potentiel thérapeutique dans le traitement de la sclérose en plaques (SEP) qui est une maladie incurable et auto-immune du système nerveux central. Leurs actions sont médiées différemment à travers leurs trois récepteurs, VPAC1, VPAC2 et PAC1. Cependant, l'implication fonctionnelle de ces derniers dans les effets curatifs du VIP ou du PACAP demeure inconnue. Dans l'optique de développer de nouveaux médicaments pour la SEP, l'utilisation d'analogues qui activent ou inactivent spécifiquement un de ces récepteurs pourrait être plus efficace que celle des peptides eux-mêmes, et pourrait de ce fait limiter les risques d'effets secondaires indésirables. Or, la complexité de la pathogénèse de la SEP ne peut être reproduite qu'en utilisant des modèles animaux ; ici des souris. Ces dernières ont été sélectionnées car c'est l'espèce la plus proche de l'Homme dans lequel les gènes peuvent être facilement manipulés. Nos procédures expérimentales ne peuvent pas être réalisées chez d'autres espèces car les processus étudiés ne sont pas conservés d'un point de vue évolutif. Ainsi, dans ce projet, nous proposons de déterminer le rôle du VPAC1, du VPAC2 et du PAC1 en utilisant :

(1) des modèles murins bien connus et les plus usités de la SEP qu'est l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis). L'objectif des expériences avec le modèle de l'EAE va exiger que les souris deviennent malades afin de suivre la progression de la maladie. Cependant, des précautions strictement conformes aux exigences de la Direction générale de la recherche et de l'innovation du Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche, vont être scrupuleusement suivies afin de « reconforter » le mieux possible nos animaux.

(2) des lignées de souris sauvages et celles dont nous avons sélectivement inactivé chacun des sous-types des récepteurs du VIP et du PACAP, soit par modifications génétiques, soit avec des inhibiteurs chimiques spécifiques de chacun d'eux. Les souris mutantes et sauvages (contrôles) âgées entre 6-10 semaines vont être utilisées. L'âge est important ici afin de travailler avec des animaux ayant atteint une maturité optimale du développement du système immunitaire.

Ensuite, nous allons induire la maladie de l'EAE à ces souris et étudier les réponses à la fois clinique et cellulaires en comparaison avec celles des souris sauvages contrôles. Ceci va nous permettre de conclure si le VIP ou le PACAP endogène nous protège normalement de la SEP via le VPAC1 et/ou le VPAC2. Cette première partie du travail qui va durer cinq ans, va nécessiter un nombre total estimé de 849 souris. Ce nombre est justifié selon des analyses statistiques (de variance (ANOVA) à mesures répétées et student-t-test) afin de le minimiser au possible.

Dans une seconde partie de notre projet qui va également durer pour cinq ans, nous allons traiter les souris sauvages atteintes de l'EAE en utilisant des analogues spécifiques d'un sous-type de récepteurs VIP/PACAP, et analyser les réponses physiopathologiques et cellulaires en comparaison avec celles des souris contrôles. Pour cela, nous allons utiliser 704 souris selon les critères statistiques énumérés précédemment.

Il devient donc légitime de conclure que les résultats qui vont être recueillis (selon des analyses statistiques de variance à mesures répétées et student-t-test) à partir de cette étude vont permettre de définir le potentiel thérapeutique de chaque récepteur et établir ainsi les premiers fondements d'une nouvelle thérapie contre la SEP ; en permettant à terme l'émergence de nouvelles molécules pharmacologiques à visée thérapeutiques.

3759. Dans le cadre de nos recherches nous étudions les mécanismes cytopathologiques et la réponse immunitaire associés aux processus infectieux. Les anticorps polyclonaux sont nécessaires pour mener nos recherches sur ces sujets, ils nous permettent de suivre différents marqueurs de l'inflammation, de l'infection ou des facteurs de l'hôte au cours de l'infection par des techniques classiques de biologie cellulaire et de biochimie.

Les rats wistar, couramment utilisés afin de produire des anticorps permettent d'obtenir une bonne quantité de sérum, selon un protocole d'une durée de 35 jours.

Mesure prise pour respecter la règle des 3 R :

Remplacement : Certains anticorps n'étant pas disponibles dans le commerce ou difficile à acheter (vue le contexte insulaire), nous devons les produire localement.

Réduction : Dans le protocole classique, deux rats sont immunisés par antigène, pour réduire le nombre d'animaux nous avons décidé d'utiliser un rat par anticorps produits, soit 20 rats au total sur 4 ans au lieu de 40.

Raffinement : L'injection de l'adjuvant de Freund génère une douleur modérée à l'endroit de l'injection durant 24h environ. Les animaux seront suivis plus particulièrement pendant les 24 heures post injection.

3760. Des études ont montré que le système nerveux autonome (SNA) pouvait réguler le système immunitaire. De quelle façon ? Le SNA est composé du système nerveux sympathique et parasympathique qui suite à une activation vont libérer des neurotransmetteurs tel que l'acétylcholine, l'adrénaline ou la noradrénaline qui agiront sur les cellules du système immunitaire. Comment ces neurotransmetteurs agissent-ils sur le système immunitaire (SI) ? Des preuves indirectes permettent de suspecter un effet du SNA sur le SI parmi lesquelles l'innervation des organes lymphoïdes ou l'expression des récepteurs à des neurotransmetteurs par les cellules du SI. Dès lors, l'intervention sur l'activité des nerfs périphériques dans le but de modifier l'activité du SI est envisageable. Ainsi, chez l'homme la stimulation du SNA est déjà utilisée pour le traitement de maladies comme l'épilepsie ou la dépression. De nos jours, plus de 50000 patients dans le monde sont implantés avec des micro-stimulateurs. Les effets de ces électrostimulations du nerf vague sont actuellement recherchés dans des maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde. En effet, il a été montré que dans des modèles d'inflammation chez la souris, l'électrostimulation du nerf vague induit une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Cette diminution de l'inflammation passe par la libération par des lymphocytes T d'acétylcholine qui se fixe sur les récepteurs cholinergiques présents à la

surface des macrophages inhibant ainsi la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Il a été montré que la sympathectomie chimique ou chirurgicale entraîne une amélioration de la réponse immunitaire adaptative à la suite d'une infection virale ou bactérienne. Ces résultats suggèrent donc que la stimulation du système nerveux sympathique peut diminuer la réponse inflammatoire dans des pathologies comme des maladies auto-immunes (Diabète de type 1).

Le but de notre projet est d'évaluer l'effet de la stimulation du SNA sur le SI en stimulant électriquement le système nerveux sympathique. Les différentes étapes du projet consistent à implanter un micro-stimulateur électrique au niveau des nerfs sympathiques et pour évaluer :

- 1- les conditions de stimulation électrique nécessaires à la libération des neurotransmetteurs du système sympathique (procédure n°1)
- 2- les conditions de stimulation de ce nerf permettant d'inhiber la réponse inflammatoire après injection d'antigènes par voie intraveineuse (procédure n°2)
- 3- les conditions de stimulation de ce nerf permettant d'inhiber l'apparition du diabète de type 1 dans un modèle de pathologie induite (procédure n°3)
- 4- les conditions de stimulation de ce nerf permettant d'inhiber l'apparition du diabète de type 1 dans un modèle de pathologie spontanée (procédure n°4)

Le nombre maximal total de souris utilisées pour ce projet est de 1044. Des tests statistiques seront réalisés à la fin de chaque expérimentation pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs des raffinements sont proposés notamment pour limiter la souffrance animale en mettant en place des protocoles adaptés d'anesthésie et d'analgésie complétés par un suivi postopératoire comprenant la mise en place des points limites précoces et adaptés. Enfin, l'utilisation de l'animal est indispensable à la conduite de cette étude car elle nécessite la préservation de l'intégrité du système nerveux et immunitaire.

3761. La prédiction et l'amélioration de l'efficacité alimentaire chez les animaux d'élevage s'avèrent essentielles pour accroître la rentabilité de l'éleveur ainsi que pour diminuer les impacts environnementaux liés à l'élevage. Cette question est particulièrement importante chez les ruminants, qui présentent la plus faible efficacité alimentaire rencontrée chez les animaux de rente. Chez l'animal en croissance, l'efficacité alimentaire est fortement affectée par l'utilisation efficace de l'azote alimentaire. En effet, pour un régime et animal donné, la capacité du ruminant à déposer du muscle à partir de l'ingestion des aliments évolue dans le temps de façon plus ou moins parallèle à l'efficacité d'utilisation de l'azote alimentaire (mais pas à celle de l'énergie). C'est la conséquence de la capacité de la protéine par opposition aux lipides à retenir des quantités importantes d'eau au sein des fibres musculaires.

Il est bien connu qu'il existe une variabilité individuelle non négligeable dans l'efficacité avec laquelle l'animal assimile l'azote alimentaire. Néanmoins, cette efficacité est coûteuse à quantifier et d'ailleurs difficilement mesurable dans des conditions d'élevage. Il s'avère donc essentiel de trouver des méthodes alternatives et faiblement invasives permettant de prédire l'efficacité alimentaire dans des conditions pratiques ou expérimentales même à l'échelle de la variabilité individuelle.

L'objectif de ce projet à 5 ans est la recherche de différents bio-marqueurs plasmatiques qui soient corrélés avec la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire chez le jeune bovin en croissance – engraissement. Pour cela et en respect de la règle des 3Rs il est proposé de réaliser cette étude en minimisant le nombre d'interventions sur chaque animal (3 prises de sang au cours de 60 jours représentant <0.1% du volume sanguin), dans des conditions de stabulation libre et sur un nombre réduit (n = 150) mais suffisant d'animaux pour mettre en évidence les relations recherchées.

3762. La méiose est le processus de division cellulaire ayant lieu uniquement dans les cellules germinales et conduisant à la formation des gamètes. Elle est constituée de deux divisions successives qui sont finement régulées pour empêcher des erreurs de ségrégation pouvant conduire à la formation de gamètes aneuploïdes (avec un nombre incorrect de chromosomes). Après la fécondation, de tels gamètes aneuploïdes conduisent à des fausses couches ou à des trisomies. Ainsi, 95% des trisomies viables chez l'Homme sont dues à une mauvaise ségrégation des chromosomes dans l'ovocyte.

Objectif : Le projet a pour objectif de mieux comprendre comment est régulée la ségrégation des chromosomes au cours de la méiose en étudiant le rôle de plusieurs gènes dans différents mécanismes qui régulent la méiose dans l'ovocyte.

Modèle utilisé : Etant un processus spécifique des cellules germinales, la méiose femelle ne peut être observée que dans les ovocytes. En absence de culture de cellule de ce type, nous avons recours au modèle animal pour obtenir des ovocytes. Notre choix s'est porté sur la souris car c'est à la fois le modèle le plus proche de l'Homme et le plus accessible à l'expérimentation. Ce projet nécessitera l'utilisation d'environ 400 souris femelles adultes pour les différentes techniques et conditions à tester pour répondre à nos problématiques. Seulement 20 souris peuvent exceptionnellement être stimulées par des hormones afin d'induire l'ovulation, et sont donc concernées par une procédure expérimentale.

Justification de la règle des « 3R » :

- Nos protocoles, élaborés et utilisés depuis des années, nous permettent de réduire au minimum le besoin en souris pour répondre à nos problématiques. Les différentes conditions sont groupées au maximum lors d'une même expérience pour réduire le nombre de souris utilisées. Les expériences sont répétées dans la limite minimum nécessaire aux tests statistiques utilisés pour l'analyse des résultats.
- Les cellules en culture sont utilisées comme modèle alternatif pour tous les tests préalables nécessaires à nos expérimentations sur l'ovocyte (ex : conditions d'utilisation d'inhibiteurs spécifiques)
- Notre élevage est effectué dans une animalerie agréée qui respecte les dernières réglementations en vigueur (directive européenne n°2010/63/UE) et les principes de stabulation optimales. Le bien être des souris est sous le contrôle d'une équipe d'animaliers compétents et formés à la détection et à la gestion des signes de stress animal.

3763. Ce projet a pour objectif de mettre en évidence une éventuelle variabilité entre différentes espèces de poissons d'intérêt halieutique, en termes de bioaccumulation, de détoxification et de sensibilité physiologique face à un contaminant métallique : le cadmium (Cd). Pour cela, des juvéniles de deux espèces de poissons seront nourris pendant deux mois avec des granulés enrichis en Cd. Cette contamination sera suivie d'une période de détoxification d'un mois durant laquelle des granulés non-enrichis seront utilisés. Cette procédure sera répétée pour 2 concentrations de Cd (3.5 et 25 µg de Cd par g d'aliment). Les concentrations maximales attendues de Cd accumulé dans les différents organes sont du même ordre de grandeur que celles observées en milieu naturel contaminé.

Les avantages de cette démarche, sans qu'il n'existe de dommages particuliers attendus, résident dans i) la compréhension des différences de bioaccumulation des éléments traces métalliques (ETM) observées en milieu naturel entre différentes espèces de poissons exploités, ii) l'identification des impacts physiologiques causés par un contaminant pouvant à terme engendrer une diminution des ressources halieutiques, iii) l'évaluation du risque sanitaire induit par la consommation de certaines espèces marines.

Les animaux utilisés pour ce projet sont deux espèces de poissons ostéichthyens à forte valeur marchande : le bar commun *Dicentrarchus labrax* et la sole sénégalaise *Solea senegalensis*. Le recours à de telles espèces est légitimé par le point i) qui exclu l'emploi d'organismes non ciblés par la filière pêche ou considérés comme moins sensibles à la douleur, tels que les invertébrés. Il a d'autre part pour objectif d'étudier l'accumulation et la répartition d'un contaminant métallique au sein des différents organes ainsi que l'efficacité de son élimination par l'organisme, ce qui rend indispensable le recours à des animaux vivants. Les organismes utilisés ne peuvent donc être remplacés par des invertébrés ni par un modèle informatique.

Pour masquer une éventuelle variabilité individuelle au niveau statistique, un nombre minimal de 9 individus doit être considéré par espèce à chaque point de prélèvement. Les durées d'exposition et de détoxication, ainsi que les intervalles de temps entre chaque prélèvement ont été choisis en concordance avec plusieurs études scientifiques.

Aux vues de ces exigences, le projet nécessite l'emploi de 600 individus comprenant les deux espèces, soit 300 bars et 300 soles pour 2 expérimentations (2 doses d'exposition).

Chaque prélèvement d'individus permettra plusieurs types d'analyses (dosage de Cd et de protéines d'intérêt, mesure de croissance) sur un grand nombre d'organes (foie, muscle, vésicule biliaire) ce qui permettra de maximiser les résultats obtenus.

Les individus seront exposés à des doses de contaminant présentes en milieu naturel, et qui peuvent être considérées comme faibles en regard de certaines concentrations utilisées dans des études toxicologiques antérieures. Ces doses seront administrées de façon chronique et n'ont pas pour but de provoquer une réaction de stress aigu de la part des organismes, mais principalement un phénomène de bioaccumulation.

De part les différentes caractéristiques mentionnées, le projet est donc conforme aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales.

3764. Le projet vise à reproduire expérimentalement une mammite à *Staphylococcus* sp., à *Streptococcus uberis*, à *Escherichia coli* ou une mammite endotoxinique chez la vache laitière en lactation. Le projet a également pour but d'évaluer l'efficacité de médicaments intramammaires ou injectables dans le traitement de ces mammites.

Les mammites sont des affections fréquentes de la glande mammaire chez la vache laitière dont les conséquences économiques sont importantes en élevage laitier. Ce projet a pour objectif l'étude de la pathologie mammaire chez la vache laitière en lactation ou au tarissement dans le cadre de la caractérisation d'un modèle expérimental et de l'étude de l'efficacité d'un produit.

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

Le nombre d'animaux utilisé sera optimisé et calculé de façon à ce que les effets attendus puissent être détectés avec un niveau de significativité adéquat. Le nombre maximum d'animaux sera fixé à 26 par procédure. Le nombre total de procédures sera de 3 par an, soit un nombre enveloppe d'animaux nécessaires sur 5 ans de 390.

Le bien-être des animaux sera évalué quotidiennement par le personnel en charge des animaux : animaliers et vétérinaires

3765. Bien que la taurine soit l'acide aminé le plus abondant dans la rétine, son rôle physiologique est peu connu. L'apport tissulaire de taurine est majoritairement lié à la nutrition, même si sa biosynthèse est effective chez la plupart des espèces, à l'exception du chat par exemple. Ainsi, chez ce dernier, une alimentation exempte en taurine conduit à des lésions irréversibles au niveau du cœur, mais également de la rétine voire du cerveau. L'apport exogène de taurine, lié à l'alimentation est donc un élément essentiel dans la physiologie de la rétine. Celui-ci est hautement dépendant de l'activité du transporteur sélectif de la taurine (Tau-T) qui permet le transport de la taurine depuis l'intestin vers le sang puis du sang vers les tissus.

De récentes études ont montré qu'un blocage chronique du transporteur de la taurine par un agent pharmacologique conduisait à une déplétion en taurine tant au niveau plasmatique que rétinien, associée à une perte des neurones de la rétine (photorécepteurs et cellules ganglionnaires). Ces données suggèrent le rôle prépondérant des taux intra-rétiens de taurine dans la survie des neurones rétiens. Les souris invalidées pour le transporteur de la taurine montrent une concentration de taurine indétectable au niveau de l'œil. Par conséquent, la lignée murine invalidée pour le transporteur de taurine constitue un modèle unique pour étudier différents niveaux de déplétion tissulaire en taurine. Ce projet consiste à caractériser le phénotype sensoriel et la dégénérescence rétinienne chez ces souris mutantes homozygotes et hétérozygotes. L'objectif est de mieux appréhender le rôle de la taurine dans la physiologie neuronale. Cette étude pourrait avoir des implications sur différentes pathologies de la rétine et plus largement du système nerveux central. Ce modèle animal pourrait conduire à terme à développer de nouvelles molécules thérapeutiques pour lutter contre les dégénérescences rétiennes.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes, le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées. Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les pools d'animaux contrôles.

3766. A l'heure actuelle, plusieurs domaines de chirurgie ouvrent progressivement leurs portes aux interventions mini-invasives et à la robotique, l'objectif principal étant de gagner en précision et d'offrir aux praticiens protection et confort lors de procédures de plus en plus pointues et complexes.

La cardiologie et de la radiologie interventionnelle connaissent de larges indications notamment le diagnostic, l'angioplastie et le stenting respectivement des artères coronaires et périphériques. Pour ce type d'intervention, les praticiens sont particulièrement exposés aux rayons X. Malgré le port de lourds équipements de protection plombés (tabliers, lunettes, protèges thyroïde, ...), ils s'exposent chaque jour à des quantités non-négligeables de rayonnements ionisants qui, cumulées, sont à l'origine de pathologies professionnelles graves (cancers, sarcomes osseux, etc.) Différentes équipes de recherche travaillent au développement de solutions de protection des médecins. L'une d'elles consiste à robotiser les déplacements des sondes de cathétérisme à l'aide d'un télémanipulateur contrôlé à distance par le médecin. Ce dernier manipule alors les cathéters et guides depuis un poste de commande distant protégé des rayonnements.

C'est dans ce contexte que nous proposons d'évaluer sur le porc la faisabilité ainsi que la performance et la sécurité de l'utilisation d'un télémanipulateur de guides et de cathéters pour le cathétérisme cardiovasculaire interventionnel.

Pour cette étude, il est prévu d'utiliser 6 porcs de taille réduite de la lignée FBM. Tous les animaux seront sacrifiés en fin de procédure.

Règle des 3R :

1- Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons prévu de réaliser sur chaque animal un maximum de gestes télémanipulés.

2- Pour réduire le mal être de l'animal lors de nos interventions :

- L'entrée des porcs dans la structure expérimentale est programmée de façon à fournir aux animaux un environnement optimum (enrichissement du milieu, mise en loge d'expérimentation au moins 8 jours avant l'intervention ...).

- Le protocole d'anesthésie fait appels aux techniques de suivis anesthésiques les plus performants (ECG, PA, pléthysmographie ...).

3- Pour le sacrifice en fin de procédure, l'animal est toujours maintenu sous anesthésie générale avant induction d'une surcharge anesthésique.

3- Le choix d'un modèle in vivo est requis pour cette étude car nous n'avons pas de méthode alternative pour répondre à nos objectifs. Contrairement à un modèle vasculaire en silicone, aussi réaliste qu'il soit, de véritables vaisseaux artériels peuvent réagir différemment à ce type d'intervention (fragilité des vaisseaux, milieu sanguin, flot pulsatile).

3767. Nous avons récemment développé une nouvelle famille de biopiles enzymatiques implantables capables de délivrer des centaines de microwatts à partir du glucose et de l'oxygène présents dans le corps d'un animal. Ce type de biopile pourra à l'avenir bénéficier de carburants potentiellement inépuisables car toujours disponibles dans l'organisme.

L'objectif de ce projet est d'implanter chez le rat une biopile enzymatique générant un courant électrique monitoré soit par un dispositif externe soit par un dispositif électronique embarqué.

Cette expérimentation nous permettra d'optimiser le dispositif en termes de puissance délivrée, de biocompatibilité et de durée de vie de la biopile.

Aucun modèle non in vivo ne peut être utilisé pour ce type d'expérimentation.

Pendant, l'ensemble des expérimentations seront réalisées dans le respect de la règle des 3 R : remplacer, réduire et raffiner. Le nombre d'animaux (36 rats Wistar) a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les animaux seront hébergés dans des cages avec enrichissement du milieu de vie. L'ensemble des procédures mises en œuvre seront réalisées sous anesthésie générale, et seront suivies de soins post-opératoires avec médication. Une surveillance quotidienne des animaux sera mise en œuvre afin de veiller à leur bien-être.

3768. La leptospirose est la plus fréquente des zoonoses au niveau mondial. C'est une infection bactérienne liée à un pathogène du groupe des spirochètes (groupe auquel appartiennent les agents de la borréliose de Lyme et de la Syphilis). C'est une maladie émergente par l'augmentation de son incidence annuelle dans de nombreux pays y compris dans l'Océan Indien où elle est considérée par l'Agence Régionale de la Santé comme une priorité sanitaire. Les incidences annuelles les plus élevées sont rapportées dans les systèmes insulaires tropicaux, en particulier aux Seychelles qui occupent le premier rang mondial. De fortes disparités dans les incidences annuelles sont cependant rapportées entre les îles de l'Océan Indien; il n'y a officiellement pas de leptospirose humaine à Madagascar et en Union des Comores. Ces écarts sont au moins en partie attribuables à la disparité des systèmes de soin et de surveillance (les symptômes associés à la leptospirose peuvent être confondus avec de nombreuses autres pathologies) ainsi qu'aux difficultés du diagnostic biologique. La nature indirecte de la transmission (via l'environnement contaminé par les urines des réservoirs disséminateurs) rend difficile la détermination exacte des lieux de contamination et justifie un recours à l'analyse spatiale pour identifier des profils environnementaux (i.e. paysages) en lien avec l'écologie de l'agent pathogène et/ou de ses réservoirs.

L'Homme n'est qu'un hôte accidentel et ne peut être considéré comme un maillon dans la chaîne de transmission. En revanche, il intervient dans cette chaîne en transformant les paysages et les écosystèmes, modifiant ainsi les aires de distribution des espèces animales réservoirs et favorisant avec ces dernières des contacts inédits.

Les systèmes insulaires sont particulièrement vulnérables aux espèces envahissantes (dont les rats) et sont l'objet de modifications anthropiques rapides et de grande ampleur (dynamique démographique, urbanisation, expansion de l'agriculture, transformation des milieux naturels). Par ailleurs, dans un contexte de mondialisation des échanges, les îles sont davantage exposées à de nouveaux agents infectieux et à leurs vecteurs, vertébrés ou invertébrés. Une investigation épidémiologique axée uniquement sur les cas cliniques n'est donc pas suffisante. Seule une approche intégrant des données épidémiologiques sur la faune domestique, sauvage ou commensale, et couplant analyses spatiale et phylogéographique apportera des informations originales contribuant à une meilleure compréhension du cycle de transmission des leptospires.

Nous proposons dans le présent projet d'aborder l'analyse du risque de leptospirose humaine dans les îles du SOOI par l'investigation (i) des facteurs de risque associés aux cas humains émergents, (ii) de la distribution spatiale des animaux réservoirs (espèces, habitats et proximité avec l'Homme), (iii) de la variabilité génétique des leptospires qui s'y multiplient et dispersent et (iv) l'intégration de ces informations au sein d'un modèle spatial (distribution des cas humains incidents, des prévalences au sein des réservoirs, et de la diversité des géotypes bactériens).

Cette investigation implique la capture et la mise à mort des animaux afin d'évaluer leur degré d'infection et d'attester leur rôle de réservoir. Sur l'île de La Réunion, 20 sites représentatifs des différents habitats ont été choisis. Pour estimer la dynamique saisonnière de la maladie, ces sites sont échantillonnés en hiver puis en été austral (saison sèche et humide). Afin de répondre aux objectifs du projet et de remplir les conditions requises pour les tests statistiques, 30 animaux seront capturés par site et par saison, soit un total de 1200 animaux. Les espèces concernées sont les rongeurs (les deux espèces de rats, *Rattus rattus* et *Rattus norvegicus*, et la souris, *Mus musculus*) et les insectivores (la musaraigne, *Suncus murinus*, et le tangué, *Tenrec ecaudatus*). Les 4 premières espèces ont été introduites par l'homme et sont considérées comme nuisibles pour l'environnement; le tangué, introduit depuis Madagascar, est classé comme gibier.

Sur Mahé, principale île des Seychelles, 15 sites ont été choisis, soit un total de 900 animaux. A Mayotte, 3 sites en milieu naturel et 3 sites en milieu urbain ont été retenus, soient 360 animaux.

Les données et connaissances générées par ce projet permettront de développer un outil géographique d'aide à la gestion du risque sanitaire pour l'instant non disponible et pourtant indispensable à une véritable politique de prévention de la leptospirose.

3769. Bien que des progrès importants aient permis de caractériser les facteurs impliqués dans la régulation de la croissance, l'appétit et le métabolisme, les mécanismes périphériques et centraux responsables de la physiopathologie des troubles alimentaires (anorexie, boulimie) et les problèmes de croissance associés sont mal connus. Nous nous intéressons à l'interaction entre des facteurs gastro-intestinaux, comme la préprogréline, connus pour moduler l'appétit et maintenir un équilibre énergétique, et des facteurs centraux comme le neuropeptide Y (NPY), la somatolibérine (GHRH) et la somatostatine (SST), qui jouent un rôle important dans la croissance staturo-pondérale. Afin de caractériser l'importance physiologique de ces facteurs dans le contrôle de la croissance, de l'appétit et du métabolisme,

notre équipe utilise des souris qui sont déficientes pour le gène de la préproghréline (KO préproghréline), du récepteur de la ghréline (KO GHS-R) et du sous-type 1 des récepteurs de la somatostatine (KO SST1). Dans ces différents modèles KO, nous combinons des approches physiologiques, comportementales et biochimiques qui permettent d'évaluer le rythme de sécrétion pulsatile de marqueurs endocrines impliqués dans la croissance et le métabolisme et de mesurer différents aspects liés au comportement alimentaire (prise alimentaire, olfaction, réponse au stress, réactions émotionnelles) dans différentes conditions nutritionnelles chez la souris. Nous recherchons également l'impact des dérèglements neuroendocriniens observés dans les différents modèles de KO dans la longévité des animaux. D'autre part, afin de comprendre comment ces facteurs agissent au niveau du système nerveux central, nous explorons l'activité neuronale chez des souris qui expriment la protéine fluorescente GFP dans différentes sous-populations neuronales d'intérêt (souris transgéniques NPY-GFP et GHRH-GFP). Ces différentes procédures sont menées en conformité avec la réglementation éthique. Les mêmes animaux sont utilisés dans différentes procédures expérimentales légères pour réduire leur nombre à son minimum (réduction). D'autre part, les approches utilisent les derniers développements technologiques pour réaliser des explorations fonctionnelles dans les conditions les moins invasives et les moins stressantes et limiter toute douleur (raffinement). Le nombre total de souris dans ce projet est de 5628 souris.

3770. L'insuffisance cardiaque est une maladie chronique évolutive dans laquelle la pompe cardiaque ne peut assurer le débit cardiaque nécessaire au fonctionnement de l'organisme. Elle constitue un enjeu majeur en termes de santé publique et c'est la pathologie cardiovasculaire qui présente le taux de croissance le plus rapide en raison du vieillissement de la population et d'une meilleure prise en charge de l'infarctus du myocarde.

La stimulation du nerf vague, qui permet de moduler l'activité parasympathique pour rééquilibrer la balance sympathico-vagale, fait partie des approches novatrices potentielles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque.

Cependant, l'excitation globale indifférenciée du nerf peut nécessiter un niveau de stimulation électrique inutilement élevé et induire, au-delà de l'effet thérapeutique souhaité, des effets indésirables.

Dans ce contexte, le projet de recherche en cours a pour but d'explorer et de valider le concept de stimulation multipolaire, sa mise en œuvre en chronique et le bénéfice qu'elle apporte par rapport à une stimulation plus classique.

Pour cela, 16 moutons sains seront implantés pour une série de tests liés aux modalités de stimulation, puis stimulés pendant 3 mois, et sacrifiés à l'issue de cette période de suivi.

Afin de réduire la souffrance des animaux, les procédures expérimentales de chirurgie se feront après une prémédication et sous anesthésie générale. Les moutons recevront une injection de morphine en début de procédure et toutes les 4 heures. Enfin, des points-limites ont été établis.

3771. Pour lutter contre le cancer, il existe plusieurs types de thérapies. En plus de la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie sont devenues des références du traitement. Cependant ces thérapies ne sont pas suffisantes et la notion de thérapie ciblée est apparue. L'immunothérapie utilisant des anticorps qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales prend tout son sens. Aujourd'hui il existe plus de 20 anticorps médicaments commercialisés et plus de 200 sont en développement. Notre objectif est donc de développer des anticorps médicament pour la prise en charge des patients atteints d'un cancer.

Ce développement suit toujours le même protocole. L'anticorps est tout d'abord sélectionné et testé sur des cellules tumorales en culture. Quand l'efficacité est démontrée dans des modèles cellulaires, les cellules tumorales sont greffées à des animaux. Les anticorps sont ensuite injectés aux animaux porteurs de tumeurs afin d'observer leur capacité à inhiber la croissance de la tumeur. Nous utilisons différents modèles animaux permettant de démontrer l'efficacité de ces anticorps sur les différents types de cancers retrouvés chez l'homme. L'expérience animal reste nécessaire étant donné que les mécanismes d'action des anticorps font appel à des mécanismes complexes qui ne peuvent pas être tous mis en évidence dans des systèmes in vitro. Les injections des cellules tumorales et des drogues sont réalisées sous asepsie. Pour leur confort, les animaux sont hébergés en groupe de 3 à 5 animaux avec enrichissement. Les animaux sont surveillés quotidiennement. Le nombre d'animaux par groupe expérimental est limité à 10. Ce nombre permet d'obtenir des résultats ayant une signification statistique évitant de devoir recommencer l'expérience.

Pour déterminer la concentration optimale d'utilisation de l'anticorps nous réalisons des études d'effet-dose sur ces animaux. Par ailleurs, sur les 5 années du projet, nous développerons différents formats d'anticorps dérivés de l'anticorps prototype. Lors de ces études, l'injection des anticorps peut aussi être accompagnée de l'utilisation de chimiothérapie ou de radiothérapie de la même façon qu'elles sont utilisées dans les protocoles standard chez l'homme.

Cette demande concerne 2000 souris : 320 souris NUDE, 240 souris NOD/SCID, 160 souris A/J et 160 souris C57BL/6.

3772. La prévalence actuelle des maladies neurodégénératives (Maladies d'Alzheimer, de Huntington, de Parkinson, etc), déjà élevée, ne peut qu'augmenter puisque l'âge est le principal facteur de risque et qu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. Cette situation impose à notre société un problème de santé publique d'une extrême acuité, nécessitant notamment des budgets de plus en plus lourds pour résoudre l'équation médicale, sociale et financière permettant de répondre à une demande de soins croissante et de faire face à la dépendance. La découverte de nouveaux traitements pour les maladies neurodégénératives, est donc, un des enjeux socio-économiques majeurs et un challenge primordial pour les industriels de la pharmacie.

Notre société de biotechnologie développe des programmes de R&D en interne et en collaboration dans le but de valider des stratégies thérapeutiques innovantes pour ces maladies. La société exploite une licence universitaire de savoir-faire (exclusive et mondiale) lui permettant d'offrir à ses clients (industries pharmaceutiques et de biotechnologie) des prestations de services et/ou des collaborations utilisant des modèles cellulaires et animaux (souris). Notre offre de service consiste à faire les preuves d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires fournis par les clients de l'entreprise), en utilisant une plateforme d'analyse préclinique intégrant des approches in vitro (cultures primaires) et in vivo (souris).

Afin d'optimiser l'efficacité des criblages de molécules, de réduire les risques d'échec des expérimentations in-vivo chez l'animal et donc de diminuer le nombre d'animaux impliqués dans les études précliniques (réduction et remplacement partiel), les candidats médicaments potentiels sont évalués in vitro sur culture primaire de neurones du cortex, d'hippocampe ou du striatum ; issus d'embryons de souris ou de rat (âgés de 16 et 17 jours respectivement), en fonction des recommandations des propriétaires des composés testés. L'utilisation des embryons de cet âge-là permet à la fois de disposer de neurones différenciés, sains et fonctionnels (contrairement à la plupart des lignées neuronales disponibles) et d'empêcher la prolifération des cellules gliales grâce à des traitements adaptés. Ce type de culture est sensible aux oligomères solubles de peptide A β (A β Os), à la huntingtine et à l' α -synucléine ; agents neurotoxiques responsables des maladies

d'Alzheimer, de Huntington, de Parkinson respectivement. Ces expériences sont réalisées en quadruplicate et en dose-réponse sur des neurones cultivés en plaques 48 puits (miniaturisation de l'essai afin de réduire le nombre de cellules à utiliser, et donc de réduire le nombre d'animaux). Les femelles gestantes seront hébergées dans de grandes cages contenant du matériel d'enrichissement environnemental (matériel de nidification et tube pour s'abriter) pour assurer leur bien-être (raffinement)
Ce projet nécessite 1500 embryons, de rat (soit 250 rates gestantes) et 3000 embryons de souris (soit 500 souris gestantes). Ceci pour une durée de 5 ans (6 embryons de rats et 12 de souris par semaine). Nous récupérerons de chaque embryon le striatum, l'hippocampe et le cortex afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

3773. Mesures sur animaux jeunes ou adultes (volailles, porcs) de l'efficacité alimentaire des matières premières, aliments et additifs destinés à l'alimentation des animaux de rentes en élevages de production.

Un objectif majeur des productions animales destinées à l'alimentation humaine est de développer des techniques alimentaires pour optimiser l'utilisation des ressources végétales nécessaires à l'alimentation des animaux: épargne d'énergie, de protéines etc..

Ainsi, les progrès dans la connaissance des besoins nutritionnels des animaux et dans l'équilibre des rations ont permis d'améliorer à la fois la croissance des animaux et les indices de conversion alimentaire.

En plus des caractéristiques des matières premières utilisées dont la connaissance doit être sans cesse améliorée, des additifs alimentaires sont développés pour améliorer la digestibilité globale de la ration, donc son efficacité, tout en préservant la santé des animaux voire en l'améliorant.

A chaque étape du développement de ces techniques et des produits, une vérification de l'efficacité est nécessaire sur les animaux en élevage pour mesurer classiquement les performances de croissance et de conversion alimentaire; des animaux sont nourris avec un aliment témoin (performance attendues connues) et d'autres sont alimentés avec des aliments de composition modifiée et/ou contenant un additif nutritionnel (acide aminé, enzymes, prébiotique ou encore probiotique).

Les conditions d'élevage expérimental sont proches des conditions d'élevage en production; à des périodes clés de leur croissance, les animaux sont pesés ainsi que la quantité d'aliment consommée ce qui permet de comparer statistiquement l'efficacité des différents régimes alimentaires entre eux.

La période d'essai proprement dite dure entre 8j et 12 semaines en fonction des espèces et des procédures mises en œuvre.

Statistiques.

Le nombre d'animaux mis en expérimentation est déterminé par un test de puissance qui conduit au nombre minimum de sujets ou de répétitions nécessaire pour espérer mettre en évidence des différences significatives entre les effets des différents traitements (un traitement = un régime alimentaire formulé spécifiquement et/ou contenant un produit à tester). (Réduction)

Logement.

Les animaux sont logés dans des conditions proches des conditions en élevage classique avec une attention particulière à la maîtrise d'ambiance, la qualité des sols et la limitation des densités. (Raffinement)

Pour les poulets, au maximum, 12 répétitions constituées de 12 parquets de 15 animaux sont mises en œuvre; le nombre d'animaux utilisés est donc limité au nombre de traitements à tester.

Pour les porcelets en post-sevrage ou en engraissement, des salles d'élevage de 90 à 96 places sont utilisées ce qui représente 18 à 12 répétitions par régimes.

Le choix des produits testés sur animaux est si possible issu de tests in vitro qui ont permis une sélection préalable afin de limiter au minimum les tests in vivo (remplacement. réduction) ; cependant, l'efficacité réelle des produits doit être in fine vérifiée sur des animaux mis en conditions d'élevage identiques aux conditions d'élevage en production.

Effectuées par du personnel parfaitement formé selon les bonnes pratiques précisément décrites dans des procédures, les manipulations des animaux sont sans conséquence attendues sur les animaux durant la période d'élevage. (Raffinement).

3774. Les leishmanioses sont des maladies parasitaires, endémiques dans 88 pays sur quatre continents que sont l'Afrique, l'Amérique du Nord et du Sud, l'Asie et l'Europe. 370 millions de personnes sont exposées au risque. Selon les estimations, il y aurait 1,3 million de nouveaux cas annuels avec un fort pourcentage de porteurs asymptomatiques et entre 20 000 à 30 000 décès. Les leishmanioses sont considérées par l'OMS comme des maladies émergentes et non contrôlées. Elles représentent la deuxième cause de mortalité et la quatrième cause de morbidité des maladies tropicales. Ces parasites sont transmis de mammifère à mammifère par la piqûre d'un insecte hématophage (se nourrissant de sang), le phlébotome femelle. En France, le parasite est *Leishmania infantum* dont le réservoir naturel est le chien. La très grande majorité des travaux réalisés sur les parasites du genre *Leishmania* sont réalisés par injection d'une quantité très importante de parasites, de l'ordre de 10^8 par injection. Or le nombre de parasites inoculé par les femelles de phlébotomes est compris entre 100 et 10 000 par piqûres, sans compter le rôle démontré de leur salive dans l'évolution de l'infection. La compréhension du rôle joué par le vecteur de ce parasite est donc primordiale.

Nos objectifs sont:

- l'infection des femelles de phlébotomes à partir d'animaux préalablement infectés (xénodiagnostique). Ces expérimentations animales sont indispensables pour bien comprendre et déterminer la charge parasitaire circulante dans le sang de l'hôte nécessaire à l'infection du phlébotome. En effet, cette charge minimale permettant d'infecter la femelle de phlébotome ne nous est pas connue.

- l'infection d'animaux sains par la piqûre de femelles de phlébotomes infectées pour tester en condition d'infection naturelle des préparations vaccinales ou des médicaments.

Pour ce projet, nous utiliserons deux espèces animales différentes pour les raisons suivantes :

- La souris BALB/c : car c'est le modèle pour lequel les réponses immunitaires à *Leishmania* ont été le plus décrits dans la littérature (principalement pour la leishmaniose cutanée à *Leishmania major*). Les connaissances acquises avec ce modèle vont permettre de diminuer le nombre d'animaux nécessaires pour répondre aux questions scientifiques.

- Le hamster syrien pour compléter les résultats obtenus dans le modèle murin. En effet, Le hamster syrien a l'avantage de posséder un fond génétique variable d'individu à l'autre et a des réactions immunitaires proches de celles obtenues chez le réservoir principal, le chien.

Nous utiliserons donc 1098 souris et 120 Hamsters sur les 3 ans de ce projet.

Pour remplacer au maximum et ainsi réduire également le nombre d'animaux nécessaire à ce projet, nous avons mis au point un système artificiel utilisant du sang humain et une membrane d'intestin de porc afin de nourrir les phlébotomes et de perpétuer l'élevage sans recourir aux modèles animaux. Pour réduire le nombre d'animaux nécessaire, nous utiliserons le modèle souris BALB/c qui est le modèle pour lequel les réponses immunitaires à *Leishmania* ont été le plus décrites dans la littérature (principalement pour la leishmaniose cutanée

à *Leishmania major*) et c'est également le modèle avec lequel le laboratoire a déjà obtenu un grand nombre de résultats en utilisant une aiguille pour les infections. Ceci nous permettra de réduire le nombre d'expérimentations et de comparer les résultats obtenus avec une infection par aiguille ou par le vecteur, dans le cadre de traitements médicamenteux et de tests de candidats vaccins canins. Pour le modèle hamster syrien, qui a l'avantage de posséder un fond génétique variable chez chaque individu, il permettra d'avoir des réactions immunitaires proches de celles obtenues chez le réservoir principal, le chien. Ce modèle est donc tout indiqué pour tester la robustesse des résultats obtenus sur souris BALB/c. Pour le raffinement, nous placerons au maximum 5 souris par cage ou 2 hamsters par cage. Les cages sont placées sur des portoirs ventilés et dans des conditions de température et de pression contrôlées en permanence. Nous répondons au maximum à la règle des 3R.

3775. Dans le but de traiter l'arthrose au moyen de bio-polymères, ce projet de recherche appliquée a pour objectif préalable d'étudier la toxicité de 4 bio-polymères chez le rat sain (non atteint d'arthrose).

Au préalable, des tests in vitro ont été réalisés sur des lignées cellulaires et aucune toxicité cellulaire n'a été décelée pour les 4 bio-polymères étudiés.

Pour ce projet, les bio-polymères seront :

- soit injectés en intramusculaire pour vérifier la toxicité systémique : évaluation de l'effet général des bio-polymères sur l'organisme par dosage des molécules pro-inflammatoires dans le sang,

- soit injectés dans le genou en zone intra-articulaire afin de vérifier l'intégrité des structures articulaires par analyse histologique.

L'innocuité des bio-polymères sera validée si aucune inflammation n'est détectée et si aucun dommage n'est causé aux articulations.

Afin d'éviter stress et souffrance chez l'animal, les procédures se feront sous anesthésie générale et les animaux seront contrôlés quotidiennement.

La procédure nécessite l'utilisation d'un total de 56 rats (Wistar), dont 36 pour les injections intramusculaires (6 rats par condition, 6 lots dont 2 lots contrôle) et 20 pour les injections intra-articulaires (4 rats par condition, 5 lots dont 1 lot contrôle). Ce nombre de rats est nécessaire pour pouvoir exploiter les résultats avec des statistiques fiables.

Ce projet représente l'étape préliminaire d'un projet d'étude clinique chez le chien. Ce travail et l'expérience acquise chez l'animal permettront ensuite de monter une étude clinique chez l'homme pour traiter ce type d'affection très répandue et pour laquelle aucun traitement efficace n'existe.

3776. Dans le but de traiter l'arthrose au moyen de cellules souches adultes associées à des bio-polymères, ce projet de recherche appliquée a pour objectif d'étudier différentes combinaisons cellules/bio-polymères chez le rat atteint d'arthrose.

Pour ce projet, l'arthrose sera induite dans le genou du rat par section chirurgicale du ligament croisé antérieur.

Une fois la lésion induite, 12 combinaisons cellules/polymères seront injectées dans le genou en zone intra-articulaire.

L'évolution de la pathologie se fera par observation des articulations en imagerie (scanner) et par analyse histologique post-mortem.

Afin d'éviter stress et souffrance chez l'animal, les procédures se feront sous anesthésie générale et les animaux seront contrôlés quotidiennement. De plus, une injection systématique d'analgésique permettra de réduire la douleur post-opératoire.

La procédure nécessite l'utilisation d'un total de 72 rats (Wistar), pour un total de 12 conditions testées (étude randomisée avec 6 pattes par condition, 12 lots).

Parmi ces 72 rats, 36 seront injectés précocement afin de prévenir l'apparition de l'arthrose, et 36 seront injectés tardivement, à un stade avancé de lésion, dans le but de guérir cette pathologie.

Ce nombre de rats est nécessaire pour pouvoir exploiter les résultats avec des statistiques fiables.

Ce projet représente l'étape préliminaire d'un projet d'étude clinique chez le chien. Ce travail et l'expérience acquise chez l'animal permettront ensuite de monter une étude clinique chez l'homme pour traiter ce type d'affection très répandue et pour laquelle aucun traitement efficace n'existe.

3777. La leptospirose est une zoonose émergente à l'échelle mondiale touchant majoritairement les régions insulaires tropicales, due à un spirochète du genre *Leptospira* dont il existe 13 espèces pathogènes décrites à ce jour. Les bactéries sont excrétées dans l'environnement par les urines des animaux réservoirs, les espèces du genre *Rattus* étant considérées comme les réservoirs principaux. La leptospirose est le prototype de maladie infectieuse à déterminisme environnemental puisque le milieu naturel conditionne la survie de la bactérie et par là sa transmission à l'homme. Les îles du Sud Ouest de l'Océan Indien (SOOI) constituent un laboratoire naturel favorable à l'investigation de ce pathogène bactérien car la leptospirose y est caractérisée par une épidémiologie contrastée entre les îles : (i) Les niveaux d'incidence sont élevés sur certaines îles, voire extrêmement élevés comme aux Seychelles (1^{er} rang mondial) alors que la maladie n'est pas décrite sur d'autres îles de la région (Union des Comores et Madagascar). Ces disparités ne peuvent être attribuées exclusivement aux performances inégales des systèmes de santé des différentes îles-Etats. Par ailleurs,

(ii) les leptospires pathogènes identifiées dans les cas humains diffèrent d'une île à l'autre tant au niveau des phénotypes LPS (sérovars) que des génomes-espèces. Il en est ainsi en particulier à Mayotte où l'espèce *Leptospira borgpetersenii* est largement majoritaire chez l'homme et le réservoir *R. rattus* alors qu'à La Réunion seule l'espèce *Leptospira interrogans* circule chez l'Homme et les rongeurs introduits. Cette représentation contrastée d'espèces de *Leptospira* pathogènes dans les îles du SOOI n'a à ce jour reçu aucune explication scientifique.

Le présent projet vise à comprendre la structuration particulière des espèces de leptospires pathogènes à Mayotte et à La Réunion.

Hypothèses de travail.

H1- Ces 2 îles, situées au cœur d'un hot spot de biodiversité, abritent des espèces mammifères réservoirs endémiques et/ou indigènes qui maintiennent et excrètent des espèces de leptospires différentes : *L. borgpetersenii* à Mayotte et *L. interrogans* à La Réunion.

La détection et le génotypage des leptospires présents dans les chiroptères (*Tadarida pumila*, *Chaerephon leucogaster*, *Taphozus mauritanus*, *Pteropus seychellensis comorensis*) se feront en amplifiant l'ADN des bactéries à partir de gouttelettes d'urine (méthodologie non invasive) prélevées sur 50 individus pour chacune des 4 espèces (soient 400 individus capturés au total). Une prise de sang permettra de tester la séropositivité des animaux et deux écouvillons nauges (rectal et trachéal) seront réalisés afin de tester la présence de virus.

La détection sur les *Rattus* sp. est réalisée dans le cadre du programme de recherche LeptOI.

H2- Ces deux îles présentent des conditions édapho climatiques différentes qui pourraient entraîner une survie différentielle de chaque génome-espèce pathogène.

La détection des leptospires pathogènes dans l'environnement sera réalisée en échantillonnant de l'eau de surface.

3778. La prise en charge chirurgicale des prolapsus génitaux (chutes d'organes pelviens) reste un problème de santé publique. Le traitement consiste essentiellement en une chirurgie reconstructrice par interposition d'un matériel prothétique au niveau vaginal. Mais les prothèses actuellement utilisées dérivent de la chirurgie viscérale et leurs caractéristiques mécaniques ne semblent pas être adaptées au système pelvien (trop rigides). Il en résulte de nombreux échecs et récurrences et d'autre part des sensations d'irritations et d'inconfort chez de nombreuses patientes.

L'objectif de ce projet porte sur le développement d'implants plus physiologiques afin d'augmenter la qualité des résultats fonctionnels et de diminuer le nombre de complications locales. Ainsi le couple « tissu vaginal-prothèse », in vivo (après cicatrisation), devra être le plus proche possible des propriétés mécaniques des tissus sains non prolapsés (non atteints de prolapsus).

Nous avons donc défini un cahier des charges de la prothèse « idéale », un protocole d'étude des processus de cicatrisation des prothèses sur un modèle animal et un protocole de tests mécaniques des matériaux (prothèses sèches et après cicatrisation).

Nous avons sélectionné le rat comme modèle animal pour sa résistance connue aux infections, son adéquation à nos conditions de réalisation d'essais (taille, cout, conditions d'hébergement) et aux vues des données de la littérature dans ce domaine d'application.

Des tests sur une série préliminaire de 30 rats nous a permis d'affiner nos conditions expérimentales dans le respect de la réglementation à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques. Le rat Wistar, mâle ou femelle de minimum 400 g a été sélectionné afin d'implanter sans difficulté les échantillons de prothèses (7X5cm) à tester. Sur des faibles effectifs (8 rats) nous avons montré une reproductibilité de nos essais et donc pu retenir un total de 20 rats par série (soit 180 rats au total) pour obtenir des résultats significatifs à 1 mois et 3 mois et pour pallier aux éventuelles complications (décès animal, infections de la prothèse, rétraction de la prothèse ...). Un protocole d'anesthésie, d'analgésie, d'implantation et d'explantation a été établi et validé.

Notre protocole d'étude en animalerie est défini selon les étapes suivantes :

- choix de 3 types de prothèses
- analgésie des rats
- implantation sous anesthésie d'une prothèse dans la paroi abdominale sur 3 séries de 20 rats (60)
- sacrifice d'un ½ effectif après à 1 et 3 mois de cicatrisation
- tests mécaniques des prothèses explantées
- tests statistiques
- tricotage et sélection de 3 nouvelles prothèses
- boucle itérative 3 fois pour obtenir la prothèse « idéale » (60X3)

Nous avons également établi un protocole d'essais mécaniques (test de traction uniaxial jusqu'à rupture) afin d'obtenir les caractéristiques mécaniques des différentes prothèses. L'analyse des résultats est effectuée à l'aide du Logiciel R (R Development Core Team 2008). Nous avons choisi une valeur de $p < 0,05$ comme résultat statistiquement significatif.

L'ensemble de ces données accumulées nous permettra de répondre à nos objectifs mais aussi de développer un modèle mathématique d'étude de la cicatrisation in vivo qui nous permettra certainement de nous affranchir des derniers essais.

3779. Le pancréas joue un rôle clef pour la digestion mais aussi pour le maintien du taux de sucre sanguin. Cet organe inclue divers types cellulaires : les cellules acinaires (pour la sécrétion d'enzymes digestives), les cellules canalaire (pour le transport des enzymes digestives) et les cellules endocrines. Ces dernières sont regroupées en des îlots de cellules, appelés îlots de Langerhans, composés de quatre différents types de cellules : alpha, bêta, delta, et PP produisant les hormones glucagon, insuline, somatostatine et PP (polypeptide pancréatique), respectivement. L'insuline induit in fine une baisse du taux de glucose sanguin (en cas d'apport sucré) alors que le glucagon promeut une augmentation de ce taux (en cas de manque en sucre).

Notre recherche se concentre sur le diabète de type 1, une maladie auto-immune qui se caractérise par la perte sélective de cellules bêta. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences, telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, etc... Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée. Ainsi, d'autres alternatives se doivent d'être développées afin de traiter efficacement les conséquences du diabète.

Dans ce but, en utilisant divers types de souris transgéniques, il fut récemment démontré que l'expression forcée du seul gène Pax4 (normalement exprimé dans les cellules bêta) dans toutes les cellules alpha (glucagon+) induit leur conversion en cellules bêta. Les cellules alpha sont alors continuellement régénérées et converties en cellules bêta fonctionnelles capables de « soigner » in vivo un diabète induit de façon chimique. Des études complémentaires démontrèrent que la source des cellules régénérées est localisée dans les canaux pancréatiques, certaines cellules canalaire ré-activant le programme de développement embryonnaire des cellules endocrines.

Notre projet de recherche consiste donc à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces processus de régénération en posant les 3 questions suivantes :

1- Peut-on induire la régénération des cellules alpha et leur conversion en cellules bêta à l'aide de petites molécules, une approche permettant potentiellement une application chez l'homme ? Pour répondre à cette question, nous avons utilisé divers cribles recherchant de petites molécules capables d'induire la conversion des cellules alpha en cellules bêta. Nos résultats préliminaires démontrent que le composé G8 induit la régénération/conversion des cellules alpha en cellules bêta en jouant sur Pax4 (brevet déposé). Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués, nous prévoyons de caractériser « en profondeur » les conséquences d'un traitement au G8 sur les différentes populations pancréatiques.

2- Peut-on forcer les cellules canalaire pancréatiques à adopter une identité endocrine ? Nous avons généré des animaux transgéniques permettant l'expression inductible de facteurs développementaux (identifiés dans nos processus de régénération) spécifiquement dans les cellules canalaire. Nos résultats préliminaires démontrent une hyperplasie en cellules bêta lorsque certains facteurs sont ectopiquement exprimés dans les cellules canalaire.

3- Quels sont les mécanismes moléculaires sous-tendant nos processus de régénération ? Grâce à un crible de micropuces, nous avons trouvé un certain nombre de gènes qui pourraient être impliqués : nous avons généré/obtenu des animaux mutants (perte-de-fonction) pour une analyse plus approfondie, ceux-ci présentant une hyperplasie en cellules insuline+.

Pour mener à bien ces 3 projets requérant des procédures similaires, le nombre d'animaux prévu est de 4320 à 5184 (présence de conditions) sur 5 ans, nombre obtenu avec un respect constant de la règle des 3R

- Remplacement : Malheureusement, la souris reste le meilleur modèle pour l'étude du diabète de type 1.
- Raffinement : Présence de points limites
- Réduction : Présence de conditions de type « GO-NO GO » et réduction du nombre d'animaux au minimum requis pour une analyse statistique valide.

3780. L'objectif de ce protocole est de caractériser le(s) rôle(s) d'un sous-ensemble spécifique de récepteurs couplés aux protéines G dans le développement embryonnaire de la souris. Plus précisément, nous nous intéressons particulièrement aux nouveaux rôles des récepteurs activés par les protéases (PAR) dans le développement embryonnaire. Nous visons également à explorer les rôles de la sphingosine-1-phosphate (S1P) et de ses récepteurs dans le développement embryonnaire ainsi que les différentes sources de S1P importantes pour l'activation des récepteurs au cours du développement. Nos données préliminaires suggèrent que la signalisation de la protéase et des lipides sont à la fois critique pour le développement embryonnaire chez la souris.

Ce projet nécessite 104 souris pour déterminer et caractériser l'implication des protéases et des lipides dans la voie de signalisation des récepteurs couplés aux protéines G dans le développement embryonnaire.

Les procédures expérimentales dans ce projet sont:

- 1) l'analyse échographique de la fonction cardiovasculaire in utero
- 2) l'injection de cellules hématopoïétiques d'embryons guidée par échographie

Le calcul du nombre d'animaux a été établi tout en permettant au projet d'obtenir le nombre suffisant de données pour répondre à la problématique.

Ces différents protocoles ne peuvent malheureusement pas être substitués par des procédures in vitro.

Afin de réduire la souffrance des animaux, les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie générale. Des antalgiques sont prévus et des points limites ont été établis. Le suivi et la prévention du bien-être des animaux ont été pris en compte dans ce projet.

3781. L'objectif de ce protocole est de caractériser le(s) rôle(s) de certains récepteurs couplés aux protéines G dans la protection de l'intégrité des vaisseaux pendant une réaction inflammatoire. Nous allons nous intéresser à la cascade d'activation de récepteurs en réponse aux lipides et aux protéases, ainsi qu'aux maladies inflammatoires ayant une composante vasculaire. Plus précisément, nous voulons explorer les rôles de la signalisation des protéases et des lipides dans des contextes de réactions inflammatoires vasculaire locale et systémique médiées par des immunocomplexes, par l'endotoxine ou d'autres médiateurs inflammatoires.

De nombreux articles ont montré que la signalisation induite par les protéases et les lipides peut moduler la fonction de la barrière endothéliale. Nous cherchons à déterminer dans le contexte de l'inflammation que l'activation des protéases, la cascade de coagulation ou la libération des lipides plaquettaires ont un rôle important dans la régulation de la barrière endothéliale.

Ce projet nécessite 4700 souris pour déterminer l'implication des protéases et des lipides dans des réactions inflammatoires. Les différentes procédures expérimentales étudiées dans ce projet sont :

- 1) Mécanisme de l'épanchement vasculaire: sur les modifications de l'endothélium par voie systémique
- 2) Mécanisme de l'épanchement vasculaire sur les modifications de l'endothélium par voie locale
- 3) Modèle d'inflammation des ganglions lymphatiques
- 4) Modèle d'inflammation pulmonaire
- 5) Modèle d'Inflammation locale médié par des immunocomplexes
- 6) Etude de survie suite à une réaction anaphylactique systémique

Le calcul du nombre d'animaux a été établi tout en permettant au projet d'obtenir le nombre suffisant de données pour répondre à la problématique des maladies inflammatoires.

Ces différents protocoles ne peuvent malheureusement pas être substitués par des procédures in vitro.

Afin de réduire la souffrance des animaux, les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie générale. Des antalgiques sont prévus et des points limites ont été établis. Le suivi et la prévention du bien-être des animaux ont été pris en compte dans ce projet

3782. Les maladies des petits vaisseaux cérébraux sont responsables de 25% des accidents vasculaires cérébraux et on estime qu'elles sont la cause de 40% des démences. La majorité des maladies des petits vaisseaux cérébraux, dites « sporadiques », résultent d'une combinaison de facteurs de risque au 1er rang desquels se situent l'hypertension artérielle et l'âge. Un petit pourcentage « 5% » de ces maladies sont héréditaires, causées par des mutations ponctuelles dans des protéines importantes pour les vaisseaux cérébraux telles que NOTCH3 (responsable de la maladie CADASIL) ou la chaîne alpha 1 du collagène de type 4 (responsable de la maladie COL4A1).

Les maladies des petits vaisseaux cérébraux évoluent sur plusieurs années avant de se manifester cliniquement, suggérant qu'il existe une fenêtre thérapeutique. Toutefois, notre ignorance des mécanismes de ces maladies fait qu'on ne dispose d'aucun traitement spécifique. En particulier, on connaît encore très mal comment l'âge, l'hypertension artérielle ou des mutations ponctuelles dans COL4A1 affectent la structure et la fonction des petits vaisseaux cérébraux. De plus, on ne comprend pas bien comment ces altérations structurales et fonctionnelles des petits vaisseaux cérébraux retentissent sur le tissu cérébral.

La souris est un animal chez lequel les manipulations génétiques permettent la création de modèles prédictifs de maladie, en particulier de maladies des petits vaisseaux cérébraux. Ces modèles rendent possibles les analyses histologiques, fonctionnelles, moléculaires et biochimiques du tissu cérébral et des petits vaisseaux cérébraux, à différents stades de la maladie.

Les souris transgéniques (RenTgCK) surexpriment la rénine, développent une hypertension artérielle chronique ainsi que les manifestations rénales et cardiaques attendues dans un contexte d'hypertension artérielle chronique. Les souris (Col4A1G498V) portent une mutation ponctuelle, identique à celle observée chez les patients COL4A1 ; ces souris développent les manifestations rénales et musculaires attendues. Jusqu'à présent, le cerveau et les vaisseaux cérébraux de ces 2 modèles de souris n'ont pas été analysés.

Nous émettons l'hypothèse que les souris RenTgCK et les souris Col4A1G498V constituent des modèles pour l'étude des formes sporadiques de maladies des petits vaisseaux et de la maladie COL4A1, respectivement.

L'objectif de cette étude est de caractériser le cerveau et les vaisseaux cérébraux dans ces 2 modèles de souris, sur le plan histologique et fonctionnel.

Chaque procédure mise en œuvre sera réalisée par des expérimentateurs chevronnés, permettant de réduire le nombre d'animaux à 5-6 souris par groupe pour mettre en évidence une différence entre les souris contrôles et les souris mutées. Par ce que les maladies des petits vaisseaux évoluent avec l'âge, les souris seront analysées à 3, 6, 12 et 20 mois. Ce projet nécessitera au total l'utilisation de 550 à 650 souris.

La réalisation de ce projet devrait déboucher sur une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie COL4A1 ainsi que des formes sporadiques de maladies des petits vaisseaux et permettre à terme l'identification de stratégies thérapeutiques dans ces affections. Une approche similaire a été conduite dans la maladie CADASIL avec succès.

3783. Évaluer l'activité anti-inflammatoire et/ou immuno-régulatrice de nouvelles entités chimiques après administration par voie topique ou systémique chez le rongeur.

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de démontrer les propriétés anti-inflammatoires et/ou immuno-régulatrices *in vivo* des composés évalués. Les données ainsi obtenues contribueront au profilage et à la sélection de molécules candidates à utiliser chez l'homme pour le traitement de désordres cutanés présentant un état inflammatoire aigu ou chronique de la peau; tels que l'érythème solaire, l'acné, la rosacée, le psoriasis, la dermatite atopique.

Dommages escomptés: Des stimuli (agents physiques comme les UV ou agents chimiques ou biologiques comme des produits sensibilisants) sont utilisés pour induire un état inflammatoire aigu ou chronique de la peau chez le rongeur. Des animaux génétiquement modifiés et exprimant un phénotype particulier avec la présence d'un état inflammatoire de la peau et/ou d'un dérèglement de la réponse immune ou d'une altération de la fonction barrière de la peau peuvent également être utilisés comme modèles d'inflammation pour évaluer le potentiel anti-inflammatoire et/ou immuno-régulateur des nouvelles entités chimiques. Ces lésions inflammatoires de la peau chez les animaux génétiquement modifiés ou les lésions induites par des stimuli sont susceptibles d'entraîner un certain niveau d'inconfort pour les animaux (par exemple: démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau). Cet inconfort pour l'animal sera maîtrisé par le choix des doses du stimulus utilisé et par le recours à un produit analgésique si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions complexes de la régulation de la réaction inflammatoire et de la réponse immune adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces: Les espèces rats et souris seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur le système immunitaire de ces modèles; de l'existence des outils d'analyses *ex vivo* spécifiques de ces espèces comme par exemple des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes; et en raison de la possibilité d'obtenir des modèles particuliers d'inflammation de la peau par modification du génome (espèce souris essentiellement).

-Nombre d'animaux: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées (immunologie, biochimie, biologie moléculaire, morphologie, etc...) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, 3 à 10 animaux par groupe expérimental seront utilisés pour permettre une analyse statistique robuste des résultats générés. Pour chaque procédure expérimentale, le nombre optimum d'animaux par groupe expérimental sera défini par une approche statistique adaptée. un maximum de 195 études par an sera réalisé et un maximum de 101475 animaux sera utilisé sur une période de 5 ans.

-Conditions d'hébergement et de soins: Les conditions d'hébergement et de soins et les méthodes utilisées ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux. L'hébergement est enrichi par la mise en œuvre de techniques d'enrichissement adaptées aux besoins spécifiques et individuels des animaux (ex : présence de tunnel dans la cage). La stratégie d'enrichissement est régulièrement revue et mise à jour.

3784. Ce projet a pour objectif de continuer notre programme de recherche scientifique qui vise à proposer à la filière de production « bovin lait » des solutions pour améliorer quantitativement et qualitativement la nutrition, la santé et les performances de production des vaches ainsi que pour diminuer leur impact environnemental. La quantification de ces améliorations nécessite la mesure de la valeur nutritionnelle des aliments et des composés d'intérêts, la mesure de l'impact de différents additifs non nutritionnels influant sur les processus de digestion et la mesure de l'efficacité alimentaire d'additifs nutritionnels. Ce projet s'applique aux aliments, aux matières premières et aux additifs nutritionnels et non nutritionnels.

L'appareil digestif des ruminants est rendu plus complexe par la présence du rumen en amont du tractus. Ce compartiment est un lieu de fermentation et de remaniement intense des nutriments qui affecte singulièrement les méthodologies d'évaluation du processus digestif mises en œuvre. Il faut évaluer la dégradation par fermentation ou non des composés d'intérêt, le devenir des produits de dégradation et la digestion postruminale.

La connaissance de la composition physico-chimique des produits s'avère insuffisante pour prédire leurs intérêts nutritionnels. Répondre à ces problématiques nécessite le recours à différentes procédures.

Les procédures *in vitro* sont systématiquement privilégiées pour cribler l'efficacité nutritionnelle des produits. Deux méthodes simulent les fermentations ruminales. La présence de 3 vaches est nécessaire pour collecter du contenu ruminal servant d'inoculum dans les processus fermentaires. L'équipement de ces animaux avec des fistules ruminales constitue une solution pour le prélèvement répété de jus ruminaux en limitant le stress des animaux. Une procédure *in vitro* (stricte) de simulation du transit gastrique est ensuite mise en œuvre. Ces méthodes utilisées individuellement ou en combinaison permettent d'évaluer des niveaux de protection/libération et biodisponibilité des nutriments. Les procédures *in situ* et *in vivo* nécessitent l'utilisation de modèles animaux chirurgicalement modifiés: équipés de fistules au niveau du rumen (*in situ*) ou du rumen et du duodénum (*in vivo*). Le recours à ces méthodes permet de cribler un grand nombre de produits en limitant à 6 et 8 le nombre d'animaux utilisés respectivement dans les procédures *in situ* et *in vivo*. Ces méthodes permettent de suivre le devenir métabolique de l'élément d'intérêt au travers de la circulation sanguine. Pour limiter la piqûre répétée des animaux, ceux-ci sont équipés de cathéters veineux. Les 16 vaches entrant dans les procédures précitées sont utilisées au maximum cinq fois par an. Cependant la procédure *in vitro* n°2 nécessitant des prélèvements de jus de rumen, non invasive, peut être répétée un plus grand nombre de fois.

Les opérations sur animaux sont réalisées par une personne habilitée. Les vaches sont nourries et logées en stabulation entravée et/ou libre avec accès au pâturage dans des conditions conformes au respect de leur bien-être et sont suivies quotidiennement par du personnel habilité. Ce personnel veille aux besoins physiologiques et comportementaux des animaux et est impliqué dans l'enrichissement du milieu dans lequel les animaux sont élevés. La longévité des animaux est optimisée (>13 ans) et est bien supérieure aux longévités observées en élevage classique (<8 ans). Les animaux sont euthanasiés uniquement par et après avis du vétérinaire sanitaire

3785. L'objectif de notre équipe est d'étudier et de caractériser le(s) rôle(s) de certains récepteurs couplés aux protéines G dans la protection de l'intégrité des vaisseaux pendant une réaction inflammatoire. Nous nous intéressons à la cascade d'activation de récepteurs en

réponse aux lipides et aux protéases, ainsi qu'aux maladies inflammatoires ayant une composante vasculaire. L'objectif de ce protocole est de produire des lignées qui pourront répondre à ces questions.

Ce projet nécessite 3560 souris mâles et femelles. La réduction du nombre d'animaux a été prise en compte tout en permettant au projet d'obtenir un nombre suffisant d'animaux pour répondre aux différentes problématiques des projets associés à cette production de souris génétiquement modifiées. Le suivi et la prévention du bien-être des animaux ont été pris en compte dans ce projet.

La procédure d'euthanasie des animaux en fin d'expérimentation est une procédure standard, réalisée dans le respect de l'éthique animal.

3786. La découverte de nouvelles structures cérébrales nous renseigne sur le fonctionnement et les pathologies du cerveau. Elle permet aussi d'envisager de nouvelles cibles neuroanatomiques pour des traitements potentiels. Le projet présenté concerne une région récemment décrite, la queue de l'aire tegmentale ventrale (tVTA pour tail of the ventral tegmental area). L'étude de sa connectivité suggère qu'elle régule l'activité des neurones dopaminergiques et qu'elle pourrait ainsi constituer le frein principal des systèmes dopaminergiques. Les principaux systèmes dopaminergiques, à savoir les systèmes mésolimbique et nigrostrié, influencent de nombreuses fonctions de l'organisme et sont impliqués dans l'étiologie et le traitement des désordres neurologiques et psychiatriques tels la maladie de Parkinson, les troubles de l'humeur et l'addiction. L'étude du contrôle exercé par la tVTA sur ces systèmes se révèle être importante pour comprendre les processus neurobiologiques qui sous-tendent ces états. Notre projet est donc une contribution à la recherche sur le contrôle de l'activité des systèmes dopaminergiques et sur le rôle spécifique de la tVTA sur ces systèmes. Le projet nécessitera 764 rats pour un total de 20 protocoles sur 5 ans et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à remplacer ou réduire chaque fois que possible le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures. Les études proposées portant sur les conséquences d'une restriction alimentaire sur une zone donnée du cerveau, elles ne peuvent être conduites qu'in vivo, le choix de l'espèce s'est porté sur le rat car c'est l'espèce chez laquelle la tVTA a été découverte et définie. Le nombre d'animaux a été établi de façon à garantir statistiquement la conclusion quant à la présence ou absence d'effet, les paramètres mesurés et la standardisation des procédures permettant de limiter ce nombre (n=8-10 animaux par groupe selon les procédures). La qualité des conditions d'animalerie contrôlées, la standardisation des animaux obtenus auprès d'un fournisseur agréé, ainsi que la standardisation des procédures expérimentales déjà maîtrisées par l'équipe de recherche, garantissent le succès des expériences proposées et l'obtention de résultats exploitables.

3787. Les maladies cardiométaboliques sont des pathologies complexes impliquant de multiples voies métaboliques et physiologiques et donc, ne peuvent pas être étudiées simplement en utilisant une approche de culture cellulaire (Remplacement). Le nombre de maladies cardiaques résiduelles représente la première cause de décès dans le monde. Malgré les traitements actuels visant à diminuer le mauvais cholestérol, il reste plus de 20 millions de patients décédant de pathologies cardiovasculaires chaque année. Il est maintenant reconnu que l'inflammation est centrale au développement de différentes pathologies inflammatoires et cardiométaboliques mais les mécanismes qui régissent cette inflammation sont mal connus. Un dérèglement du système hématopoïétique et immunitaire serait à l'origine de l'inflammation et pourrait être régulé par différentes voies métaboliques. Une illustration de cette hypothèse est la visualisation de plaques athéromateuses inflammatoires chez l'homme par imagerie en utilisant un analogue du glucose, le 18F-FDG. Dans ce contexte, nous avons récemment mis en évidence une altération des voies glycolytiques des cellules hématopoïétiques et immunitaires dans des maladies cardiométaboliques.

Nous proposons donc d'étudier les voies métaboliques du système hématopoïétique et immunitaire dans des pathologies cardiométaboliques en utilisant des modèles de souris développant de l'athérosclérose (souris ApoE-/- et Ldlr-/-). Nous avons choisi le modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulation génétique liée aux maladies cardiaques.

Compte tenu de l'augmentation du glucose des cellules inflammatoires dans les pathologies cardiovasculaires, nous proposons d'étudier le rôle du transporteur majoritaire au glucose dans ces cellules et de déterminer si une altération des voies métaboliques en aval dans les cellules hématopoïétiques et immunitaires pourrait modifier les pathologies cardiométaboliques, en particulier l'athérosclérose. Pour comprendre l'implication de ces mécanismes chez l'Homme, il nous est maintenant nécessaire de les étudier sur l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. En termes de réduction, nous avons calculé au plus prêt le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure expérimentale et choisi des méthodes statistiques adaptées afin de garantir la justesse des résultats obtenus. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthique. Nous allons utiliser 753 souris réparties sur 5 ans.

3788. Les maladies cancéreuses sont des pathologies complexes impliquant de multiples voies métaboliques et physiologiques et donc, ne peuvent pas être étudiées simplement en utilisant une approche de culture cellulaire (Remplacement). Il est maintenant reconnu que l'inflammation est centrale au développement de différentes pathologies cancéreuses mais les mécanismes qui régissent cette inflammation sont mal connus. Un dérèglement du système hématopoïétique et immunitaire serait à l'origine de l'inflammation et pourrait être régulé par différentes voies métaboliques. Nous avons récemment mis en évidence une altération des voies glycolytiques des cellules hématopoïétiques et immunitaires dans des maladies cancéreuses. C'est dans ce contexte, que nous proposons d'étudier les voies glycolytiques du système hématopoïétique et immunitaire dans des pathologies cancéreuses en utilisant différents modèles de souris présentant des adénocarcinomes pulmonaires (souris KrasG12V fl/fl). Après induction de tumeurs chez ces souris par recombinaison génétique et inhibition spécifique de certains gènes, nous effectuerons différents tests (calorimétrie, incorporation du glucose dans la tumeur, mesure de paramètres sanguins) pour évaluer l'importance des voies glycolytiques dans ces cancers. Nous avons choisi le modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulation génétique liée aux maladies cancéreuses.

Ces études pourraient permettre d'élargir nos connaissances des voies métaboliques dans les cellules hématopoïétiques et immunitaires lors de pathologies cancéreuses et pourraient ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à moduler ces différentes voies métaboliques dans ces maladies. Pour comprendre l'implication de ces mécanismes chez l'Homme, il nous est maintenant nécessaire de les étudier sur l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. En termes de réduction, nous avons calculé au plus prêt le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure expérimentale et choisi des méthodes statistiques adaptées afin de garantir la justesse des résultats obtenus. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement

systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthiques. Nous allons utiliser 160 souris expérimentales réparties sur 3 ans.

3789. Les maladies cancéreuses sont des pathologies complexes impliquant de multiples voies métaboliques et physiologiques et donc, ne peuvent pas être étudiées simplement en utilisant une approche de culture cellulaire (Remplacement). Il est maintenant reconnu que l'inflammation est centrale au développement de différentes pathologies cancéreuses mais les mécanismes qui régissent cette inflammation sont mal connus. Un dérèglement du système hématopoïétique et immunitaire serait à l'origine de l'inflammation et pourrait être régulé par différentes voies métaboliques. Nous avons récemment mis en évidence qu'une altération du HDL-cholestérol était intimement liée à la prolifération des cellules hématopoïétiques et immunitaires dans des maladies cancéreuses. C'est dans ce contexte, que nous proposons d'étudier les voies d'efflux du cholestérol dans des pathologies cancéreuses en utilisant différents modèles de souris présentant des anomalies cancéreuses (souris KrasG12D fl/fl). Nous avons choisi le modèle de souris car c'est un modèle standard, bien reconnu dans le domaine scientifique pour l'investigation de manipulation génétique liée aux maladies cancéreuses. Ces études pourraient permettre d'élargir nos connaissances du HDL-cholestérol dans la pathologie cancéreuse et pourraient ouvrir de nouvelles perspectives de traitement. Pour comprendre l'implication de ces mécanismes chez l'Homme, il nous est maintenant nécessaire de les étudier sur l'animal car il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de tenir compte de toute la complexité et de toutes les interactions existantes entre cellules et organes dans un organisme. En termes de réduction, nous avons calculé au plus prêt le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure expérimentale et choisi des méthodes statistiques adaptées afin de garantir la justesse des résultats obtenus. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthiques. Nous allons utiliser 468 souris réparties sur 3 ans.

3790. Réalisation de prélèvements de fluides biologiques, organes et/ou tissus chez le rongeur (rats, souris, hamsters, cochons d'Inde) ou le non-rongeur (miniporc) à des fins de mise en place ou de réalisation de manipulations ex-vivo ultérieures. En effet, les modèles ex-vivo développés dans l'entreprise permettent une meilleure compréhension de la physiopathologie des maladies et désordres cutanés comme l'acné, la rosacée, la dermatite atopique travaillés dans l'entreprise. Ils permettent également la mise au point de nouveaux bio-marqueurs et de nouvelles cibles pharmacologiques nécessaires au développement des futurs médicaments. La mise au point de ces modèles nécessite l'utilisation de cellules issues d'organes ou tissus d'origine animale, et très peu d'animaux sont nécessaires pour ce faire.

Avantages: La procédure expérimentale mise en oeuvre permet de prélever tout matériel biologique (fluides ou organes/tissus) afin de mettre en place des modèles expérimentaux ex-vivo non cliniques à forte valeur ajoutée permettant après validation d'évaluer l'efficacité et/ou l'innocuité des molécules candidates de l'entreprise dans le domaine de la dermatologie. Par ailleurs ces prélèvements sont utiles dans la compréhension des processus biologiques et physiologiques associés aux pathologies d'intérêt dans la société. Aussi ces prélèvements s'avèrent également nécessaire lors du développement des méthodes analytiques (ex : hémato-biochimie) ou bioanalytiques en utilisant ces spécimens biologiques comme matrice. Enfin, l'utilisation de fluides biologiques et d'organes permet, à partir d'un très faible nombre d'animaux (≤ 5 pour le rongeur), de réduire le nombre d'animaux qui auraient été nécessaire, pour répondre au même objectif scientifique, c'est-à-dire une étude in vivo complète avec le souvent plus de 40 animaux (5 par groupe, pour 8 conditions de tests différentes).

Dommages escomptés: Il y a très peu de dommages escomptés attendus, dans la mesure où seuls des prélèvements sanguins ou fluides biologiques accessibles de manière non-invasive (ex : urines - fèces) sont réalisés dans le respect des règles éthiques. Aussi le faible nombre d'animaux nécessaires à ce type de prélèvements est obligatoirement issu du stock de l'animalerie pour un non-rongeur (dans le cadre d'une réutilisation approuvée par le vétérinaire). Les rongeurs peuvent aussi être issus du stock de l'animalerie, dans la mesure possible.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): Ce projet correspondant à une seule procédure représente lui-même une méthode alternative de choix, les données générées permettant de remplacer des études précoces qui auraient nécessité beaucoup plus d'animaux.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement):

-Choix des espèces: Les espèces rongeurs seront utilisées en raison de l'abondance de littérature sur les cibles thérapeutiques travaillées dans l'entreprise, de l'existence des outils d'analyses ex vivo spécifiques de ces espèces comme par exemple des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes. L'espèce porc miniaturisée (miniporc) sera également utilisée pour les mêmes raisons suscitées et pour sa taille, permettant le recueil de grandes quantités de fluides biologiques sans altération de son état physiologique et dans le respect des règles éthiques.

-Nombre d'animaux: Le nombre d'animaux sera modulé en fonction du nombre de manipulations expérimentales réalisées dans l'année. Il est rappelé que la priorité est donnée aux animaux issus d'autres projets autorisés et terminés et faisant partie du stock de l'animalerie (en attente de réutilisation).

Un maximum de 600 rongeurs (150 rats, 400 souris, 25 hamsters et 25 cobayes) et/ou 25 mini-porcs sur une période de 5 ans seront utilisés pour de multiples prélèvements biologiques.

3791. Les anesthésiques locaux sont les produits utilisés pour la réalisation d'anesthésies locorégionales centrales ou périphériques. Ces solutions sont efficaces mais non dénuées d'effets secondaires avec notamment deux types de toxicité : une toxicité neurologique et une toxicité cardiaque, qui est la plus grave puisqu'elle peut entraîner des troubles du rythme et de la conduction responsables d'arrêt cardiaque. Les seuils toxiques d'anesthésiques locaux ont toujours été établis à partir d'accidents survenus pour des doses importantes mais ces seuils ne sont pas connus précisément à ce jour.

Un antidote existe pour les intoxications aux anesthésiques locaux ; il s'agit des intra lipides. C'est aujourd'hui l'antidote de référence en cas d'intoxications aux anesthésiques locaux. Ses modalités d'action sont méconnues avec plusieurs théories actuellement.

Le dosage sanguin des anesthésiques locaux est réalisable mais n'a pu être effectué dans le milieu interstitiel du tissu d'un organe puisqu'aucune technique ne le permettait.

La microdialyse est une technique nouvelle permettant de mesurer la concentration d'une molécule dans le milieu interstitiel du tissu d'un organe.

Cette technique permettrait de réaliser des dosages d'anesthésiques locaux dans le tissu myocardique notamment où une concentration élevée semble être responsable d'accidents cliniques graves. L'intérêt de cette technique permettrait d'affiner la pharmacocinétique et la pharmacodynamie des anesthésiques locaux utilisés aux doses thérapeutiques et toxiques.

Le porc sera l'animal utilisé dans ce projet puisque c'est un modèle d'étude proche de la physiologie humaine. Le comportement hémodynamique est proche de celui de l'homme. La taille du porc permet d'utiliser le matériel identique à celui de l'homme puisque la taille

de son cœur est suffisamment importante pour les cathéters de microdialyse et la taille de ses vaisseaux permet la mise en place des dispositifs interventionnels identiques à ceux de l'homme.

Le but de cette étude est double :

- Déterminer chez l'animal les concentrations tissulaires toxiques d'anesthésiques locaux grâce à la microdialyse tissulaire myocardique et les comparer à des dosages musculaires (quadriceps) après perfusion intraveineuse de doses croissantes d'anesthésiques locaux pour déterminer la dose toxique,

- Evaluer l'effet de la perfusion d'intra lipides sur les concentrations tissulaires et sériques toxiques d'anesthésiques locaux réalisée lors de la survenue d'effets indésirables cliniques liés à la toxicité des anesthésiques locaux.

Selon la littérature, 10 porcelets seront nécessaires pour démontrer la décroissance des différents taux de bupivacaine après injection d'intra lipides.

Le principal risque de cette manipulation réside dans l'apparition d'une fibrillation cardiaque lors de la mise en place du cathéter de microdialyse cardiaque.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

(Remplacer) Il s'agit d'une étude descriptive qui a pour objectif de démontrer une théorie pharmacocinétique. Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'atteindre cet objectif dans des conditions le plus proches possibles des cas cliniques.

(Réduire) Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum, défini sur les données de la littérature. Ces animaux permettent en parallèle de former les médecins anesthésistes réanimateurs aux gestes de cathétérisation sous échoguidage puisque l'ensemble des cathéters sont placés par voie percutanée sous contrôle échographique. L'acquisition de ces compétences est requise pour la validation de leur formation.

(Raffiner) La souffrance et l'angoisse de l'animal seront prévenues par la réalisation d'une anesthésie générale pendant toute la durée du protocole. Lors de la réalisation d'un acte douloureux, un morphinique sera administré à l'animal. Aucun animal ne sera réveillé, l'euthanasie étant réalisée sous anesthésie générale.

3792. Le développement neural regroupe l'ensemble des processus qui accompagnent la croissance du système nerveux depuis les stades embryonnaires jusqu'à la mise en route des fonctions cérébrales. Les connexions neuronales qui constituent le cerveau sont organisées de manière très précise et peuvent relier des neurones distants de plus d'un mètre. Comprendre comment le cerveau se met en place est un enjeu majeur en médecine car un grand nombre de maladies neurologiques sont liées à des anomalies du développement. La liste de ces pathologies est longue et ne cesse de s'allonger ; on tend aujourd'hui à y ajouter la schizophrénie et certaines formes d'autisme.

Au cours du développement, les neurones naissent à proximité de la paroi des ventricules cérébraux mais ils vont immédiatement s'en éloigner et migrer jusqu'à leur destination finale afin de former les différentes structures nerveuses. Depuis quelques années, il a été identifié que les molécules présentes dans le cerveau embryonnaire étaient capables de guider la migration neuronale. L'apparition de nouvelles techniques, telle que l'électroporation, permet aujourd'hui de rendre des neurones embryonnaires fluorescents et ainsi de pouvoir les suivre pendant leur migration en utilisant la microscopie en temps réel. La comparaison de la migration entre des souris sauvages et mutantes nous permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la migration neuronale.

Pour ce projet, 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. Notre modèle d'étude principal sera le système des neurones précérébelleux (olive inférieure, noyaux du pont, noyau réticulaire latéral) qui jouent un rôle très important dans la régulation de la motricité et l'apprentissage moteur. Nous avons identifié des molécules (notamment de la famille des Slits ou de la Nétrine-1 et leurs récepteurs, Robo, DCC, UNC5...) qui sont exprimées par les neurones précérébelleux en migration. Nos travaux préliminaires, montre que la migration des neurones est anormale chez les souris mutantes pour ces molécules mais leur mécanisme d'action n'est pas connu.

Parmi les lignées que nous souhaitons étudier se trouvent des souris mutantes conditionnelles qui nous permettront d'analyser les conséquences de l'absence de ces gènes spécifiquement dans neurones précérébelleux ou dans les cellules qu'ils rencontrent pendant la migration.

Le nombre total de souris utilisées dans ce projet est estimé à 2575 souris adultes, 3434 embryons (E12-E15), 90 embryons (E16-E17) et 240 souriceaux (P0-P30), pour 5 ans. Ce nombre important s'explique principalement par la diversité des modèles transgéniques utilisés et la redondance de l'expression des gènes ciblés. Ce projet implique au moins 6 chercheurs à temps plein.

Il faut également souligner ici que les molécules étudiées dans ce projet sont toutes exprimées dans un grand nombre de cancers et qu'elles jouent probablement un rôle dans la migration des cellules tumorales. La compréhension de leur mode d'action est donc d'une grande importance en dehors du champ des neurosciences.

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, des maisonnettes et des bâtons à ronger. Le nombre d'animaux utilisés 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 ».

3793. L'arthrose est une maladie dégénérative des articulations. Elle se caractérise par une disparition du cartilage et une modification de l'os sur lequel il repose. On sait actuellement que les communications entre le cartilage et l'os jouent un rôle crucial dans le maintien de l'articulation dans un état sain. L'interface entre le cartilage et l'os se modifie au cours de l'arthrose avec notamment un développement de vaisseaux.

Nous pensons que le développement de ces vaisseaux joue un rôle important dans la progression de l'arthrose. La thrombospondine-1 (TSP-1) est un inhibiteur du développement des vaisseaux qui est produit par le cartilage sain et en moins grande quantité par le cartilage arthrosique. Nous voulons déterminer si l'absence de TSP-1 favorise le développement de vaisseaux à l'interface entre le cartilage et l'os et in fine de l'arthrose. En créant une arthrose chez les souris TSP-1-/- par déstabilisation chirurgicale du ménisque au genou, nous déterminerons si les souris TSP-1-/- développe une arthrose plus sévère 4 et 8 semaines plus tard.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 356 souris expérimentales pour une durée maximale de 4 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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

3794. La biologie de la cellule cancéreuse présente une plasticité qui peut être modulée ou reprogrammée pour maintenir un état plus différencié et moins agressif afin de limiter sa croissance et sa capacité à métastaser. Le but principal de notre projet est fondé sur ce concept. Nous cherchons à identifier des facteurs pouvant induire la reprogrammation des cellules tumorales. Nous étudions, un complexe neuropeptide et son récepteur ainsi que des hormones et anti-hormones stéroïdiennes utilisées à des fins thérapeutiques.

Nous avons montré que lorsque le complexe, neurotensine /récepteur de haute affinité, NTS/NTSR1, est présent dans les cellules cancéreuses les effets cellulaires à caractère oncogénique (croissance, adhérence, invasion, migration) sont amplifiés. La forte expression du NTSR1 est un marqueur pronostique indépendant dans les tumeurs du sein et du poumon. Dans des tumeurs expérimentales de sein et de poumon, nous avons démontré la contribution du complexe NTS/NTSR1 dans la croissance des tumeurs et l'émergence de métastases.

Notre projet est de comprendre les mécanismes cellulaires, moléculaires et les signalisations mises en jeu. Pour cela, nous développons des approches précliniques utilisant les lignées cancéreuses afin de démontrer la contribution de ce complexe dans la croissance tumorale et dans le processus métastatique. Notre projet est de produire molécule thérapeutique ciblant le complexe NTS/NTSR1. De tester leur efficacité sur la progression tumorale et la réponse aux agents antitumoraux utilisés dans les protocoles cliniques. Notre projet de recherches translationnelles, développe ces aspects précliniques sur des tumeurs expérimentales, à partir de lignées cellules cancéreuses présentant différents degrés de différenciation et d'agressivité. L'objectif à terme étant de déterminer des combinaisons thérapeutiques permettant de diminuer la progression tumorale chez l'homme.

Aussi, nous souhaitons utiliser dans le cadre de ce projet un modèle de xénogreffe chez la souris immunodéprimée. Ce projet devrait utiliser au maximum 600 souris sur 5 ans. Chaque groupe de traitement inclura 12 souris (6 contrôles et 6 traités). Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal qui reste cependant indispensable. Dans le cadre du raffinement, les animaux seront observés quotidiennement et des décisions adaptées seront prises par des personnels formés. De plus, les animaux auront à leur disposition un enrichissement du milieu adapté aux espèces nidicole (coton, maison, etc.).

3795. Le couplage chimique de principes actifs anticancéreux à des polymères vinyliques, entraîne la formation de bioconjugués qui ont la capacité de s'auto-organiser sous forme de nanoparticules en milieu aqueux. Ces "nanomédicaments" sont capables de protéger la molécule active de la dégradation par les enzymes de l'organisme, de l'adresser sélectivement vers le tissu ou la cellule cible, et d'en contrôler la libération, permettant ainsi de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la lutte contre les cancers. L'évaluation de l'efficacité anticancéreuse de ces nanomédicaments doit être précédée par la détermination de la dose maximale tolérée pour chacun des nanomédicaments étudiés. Cette étude est fondamentale afin de pouvoir déterminer la dose la plus efficace avec une tolérance satisfaisante. Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche.

Les essais *in vitro* sont préférés, si possibles, afin de remplacer l'expérimentation animale. Néanmoins le remplacement ne peut pas toujours être proposé. Jusqu'à présent, la connaissance des organismes vivants est loin d'être complète et donc il n'est pas possible les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles informatiques. Certaines études doivent donc être menées sur des animaux entiers.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre de ces animaux. Une planification statistique minutieuse permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également d'importance et le degré de souffrance des animaux sera toujours minimisé. Les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'individus compatibles. L'entretien des animaux sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées et surveillées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Les espoirs dans les nanotechnologies laissent entrevoir la perspective de nouveaux médicaments ou de médicaments plus efficaces. Il y a d'ailleurs déjà des nanomédicaments sur le marché et d'autres en phase clinique III pour le traitement de maladies qui n'ont pas de possibilité de traitement actuellement. Les animaux ont un rôle inestimable en recherche expérimentale car ils permettent de mener des recherches concernant un médicament potentiel en révélant notamment tout effet nocif avant son utilisation chez l'Homme.

Pour la réalisation de cette étude nous utiliserons des souris femelles athymiques nude (nu / nu) Ces souris sont caractérisées par l'absence du thymus la glande qui produit les lymphocytes T. Par conséquent, elles sont incapables de rejeter les cellules humaines qui seront implantées pour le développement de modèles de tumeurs successivement utilisés pour les études d'efficacité anticancéreuse.

Dans le cadre du développement de modèles de tumeur en utilisant des cellules cancéreuses murines, des souris femelles balb/c seront utilisées.

Pour la réalisation ces étude le nombre total d'animaux estimé sur les 5 années est de 1820 souris.

3796. Le couplage chimique de polymères vinyliques à des petites molécules médicamenteuses hydrophiles permet d'obtenir des nanoparticules, et ainsi d'injecter des molécules normalement instables dans le torrent circulatoire par voie intraveineuse. De plus, il a été observé que ce procédé de conjugaison permettait d'améliorer la pénétration intra-cellulaire des principes actifs.

Ainsi, l'utilisation de telles nanoparticules permettra l'administration par voie intraveineuse de principes actifs à ce jour inutilisables suite à leur instabilité dans le sang, et de diminuer la résistance des cellules à certains traitements. Afin de pouvoir développer une telle approche, l'étude de la pharmacocinétique, de la biodistribution et de l'interaction avec les lipoprotéines plasmatiques de ces nanoparticules de bioconjugués est essentielle afin de connaître et de maîtriser les quantités de principe actif circulant dans le sang et internalisées par les organes après injection. Cette étude permettra une meilleure maîtrise de la dose injectée, permettant ainsi d'optimiser l'obtention d'un effet

pharmacologique significatif tout en évitant tout phénomène de toxicité. Pour réaliser cette étude, des bioconjugués radiomarqués obtenus par conjugaison covalente de la molécule radiomarquée (marquage au tritium ou au carbone 14) d'intérêt (e.g. gemcitabine, adénosine, doxorubicine, etc.) aux polymères vinyliques ont été synthétisés.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche.

Les études préliminaires *in vitro* permettront le criblage de différentes formulations et seulement un nombre limité de formulations sera testé *in vivo*, ce qui permet une réduction du nombre de ces animaux. Une planification statistique minutieuse permet de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également d'importance : les animaux seront hébergés dans des groupes stables formés d'individus compatibles et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Pour la réalisation de l'étude de pharmacocinétique et biodistribution nous utiliserons des souris. Pour chaque nanomédicament on utilisera la même souche que celle utilisée pour les études toxicologiques et/ou d'efficacité.

Pour l'étude de l'interaction avec les lipoprotéines plasmatiques, des rats Sprague Dawley mâles seront utilisés. Cette étude sera réalisée sur les rats compte tenu du volume de sang nécessaire pour étudier l'interaction des nanoparticules et des molécules en forme libre radiomarquées avec les lipoprotéines plasmatiques. En effet le volume sanguin prélevé doit être adapté à l'animal et compatible avec le dosage des substances utilisées

Pour l'évaluation de la pharmacocinétique et biodistribution on utilisera 120 souris pour chaque molécule anticancéreuse et nanovecteur étudié. Pour évaluer l'interaction avec les lipoprotéines plasmatiques on utilisera 120 rats pour chaque molécule anticancéreuse et chaque nanovecteur. On prévoit d'effectuer 5 études de biodistribution et 5 études d'interaction avec les lipoprotéines par an ce qui correspond à un nombre total estimé de 3000 souris et 3000 rats sur 5 ans.

3797. Un enjeu majeur des neurosciences est de comprendre comment le système nerveux organise des fonctions cognitives qui régissent le comportement des animaux.

À cette fin, nous utilisons la larve de poisson zèbre comme modèle animal, et une approche multidisciplinaire combinant l'imagerie optique de l'activité des circuits neuronaux (plus de 4000 neurones simultanément) à une résolution cellulaire, des tests comportementaux, des méthodes d'analyse des données ainsi que des techniques optogénétiques de pointe pour manipuler l'activité neuronale. La larve du poisson zèbre permet de combiner ces techniques chez un animal intact grâce à sa peau transparente, sa petite taille, son génome connu et la vaste librairie de lignées mutantes et transgéniques disponibles.

Ce projet nous permettra de mieux comprendre la façon dont l'information circule à travers le système nerveux. Comment les stimuli sensoriels sont-ils détectés et traités ? Comment peuvent-ils mener à des comportements moteurs ?

Ce projet prévu pour cinq ans impliquera 6 chercheurs. Nous prévoyons l'utilisation d'environ 4000 larves, âgées de 2 à 9 jours, pour les expériences du projet. Les poissons adultes ne sont utilisés que pour la production d'embryons. Cette population de poissons adultes est composée d'environ 24 lots de mutants (nacre et mec2) et de 82 lots de différentes lignées transgéniques exprimant en majorité des outils optogénétiques. Chaque lot (aquarium de 10 litres) est composé d'environ 10 à 20 poissons. Chaque aquarium est spécialement désigné pour la stabulation des poissons zèbres avec une circulation d'eau, filtrage et oxygénation adaptés aux poissons zèbres. La colonie adulte correspond à environ 1600 poissons.

Pour diminuer les souffrances subies par les animaux en expérimentation, nous prenons les mesures suivantes pour respecter la règle des 3Rs (réduire, raffiner et remplacer) :

Nous utilisons des techniques d'imagerie, méthode non invasive, sur des larves intactes de poisson zèbre. Ceci ne cause aucune souffrance particulière aux larves. De plus, nous manipulons avec extrême précaution les larves, car nos projets (analyse de l'activité cérébrale) demandent le minimum de perturbation possible pour récolter des données fiables. D'autre part, les pontes génèrent un grand nombre d'embryons. Nous euthanasions la plupart de ces embryons pour n'élever que le nombre minimal d'embryons nécessaires aux expériences. Les larves, après la fin des expériences, sont immédiatement euthanasiées. Au laboratoire nous utilisons les embryons d'une même ponte pour plusieurs expériences. De plus, quand possible nous utilisons les mêmes expériences, mais analysées d'une manière différente pour répondre aux questions des projets différentes. La larve du poisson zèbre est le seul modèle vertébré que nous permet de répondre aux questions scientifiques du projet, en utilisant des techniques entièrement non-invasives. Malheureusement, la complexité fonctionnelle du cerveau ne nous permet pas l'utilisation des modèles *in silico*. Également, notre projet implique l'analyse des liens existant entre des stimuli sensoriels, l'activité neuronale et le comportement. L'utilisation de modèles *in vitro* ne peut donc pas être envisagée.

3798. L'excitabilité cellulaire, soit la capacité d'une cellule telle qu'un neurone à générer un potentiel d'action, est entièrement dépendante de son potentiel de membrane et des canaux ioniques exprimés par cette cellule. Les canaux potassiques K2P, et en particulier le canal TREK1, joueraient donc un rôle essentiel dans l'excitabilité cellulaire et la transmission d'information dans le cerveau.

Leur rôle physiologique dans les différentes fonctions neuronales reste encore peu connu malgré leur implication dans des troubles neuronaux telles la dépression et l'épilepsie. Comprendre le rôle physiologique de TREK1 permettrait de mieux appréhender les pathologies lui étant associées et de le définir comme cible thérapeutique ou gène candidat.

L'étude du rôle des canaux dans l'excitabilité cellulaire implique de pouvoir activer et/ou désactiver rapidement ces canaux. En l'absence de molécules inhibitrices sélectives pour ces canaux commercialement disponibles, cette étude est difficile.

Nous avons développé une modalité de contrôle du canal TREK1 par l'expression d'une sous-unité protéique rendant le canal modulable par la lumière. Ce contrôle par la lumière est réversible et permet d'étudier les effets d'une activation / inactivation rapide du canal sur une même préparation. En comparant les données obtenues lorsque TREK1 est ouvert à celles obtenues lorsque celui-ci est fermé, il sera alors possible de définir le rôle de ce canal dans différentes fonctions neuronales (excitabilité, communication inter-neuronale).

Aucune lignée de culture cellulaire ne peut reproduire les caractéristiques spécifiques des neurones et l'étude physiologique d'un canal *in vitro* requiert donc son étude dans un tissu natif (tranches de cerveaux fraîches ou en culture). Ces préparations sont difficiles à transférer avec le niveau d'efficacité nécessaire à la validation d'effets physiologiques. Ces préparations *ex-vivo* seront utilisées en priorité comme méthode de remplacement à l'expérimentation.

Afin de pouvoir étudier *in vitro* les fonctions du canal TREK1, nous souhaitons faire exprimer la sous-unité modulable par la lumière dans certaines parties du cerveau par électroporation pendant les dernières phases du développement *in utero*. Cette méthode permet l'expression de la protéine de manière ciblée dans le temps et dans la zone à étudier et se maintient pendant plusieurs semaines.

Notre projet prévoit l'électroporation de 90 portées de souris, pour permettre l'expression de la sous unité TREK1 modulable par la lumière et d'un gène rapporteur (GFP) pour distinguer les cellules transfectées. La procédure d'électroporation sera réalisée avec les mesures de raffinement suivantes : traitements analgésiques systématiques, critères d'arrêt précoces dans le suivi des animaux.

Les animaux issus de ces électroporations in utero seront sacrifiés pour la collecte du cerveau entre 0 et 35 jours d'âge pour permettre l'étude électrophysiologique. Le rôle de TREK1 sur l'excitabilité neuronale ou les propriétés synaptiques sera évalué en électrophysiologie sur ces préparations, lorsque le canal TREK1 est ouvert ou fermé en fonction de la lumière appliquée. Ainsi chaque préparation est son propre contrôle, permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Le nombre total d'animaux utilisés par le projet sera au plus de 810, incluant les femelles gestantes et les animaux issus de l'électroporation.

3799. La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie liée au vieillissement caractérisée par l'incapacité de générer de nouveaux souvenirs. Elle résulte notamment de la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connections, les synapses, dans les régions cérébrales comme l'hippocampe et le cortex, impliquées dans la mémoire et les fonctions intellectuelles. La neurotoxicité des oligomères solubles du peptide β -amyloïde (A β Os) est centrale dans la perte synaptique et neuronale précoce de la maladie. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires) en utilisant une plateforme d'analyse préclinique intégrant des approches in vitro (cultures primaires de neurones de rat et/ou souris) et in vivo (souris).

Afin d'optimiser l'efficacité des criblages de molécules, de réduire les risques d'échec des expérimentations chez l'animal et de diminuer le nombre d'animaux impliqués dans les études précliniques (réduction), les candidats médicaments potentiels sont évalués selon un protocole spécifique :

- Evaluation des effets neuroprotecteurs in vitro sur culture primaire de neurones de rat et/ou souris. Ce projet nécessite 480 embryons de rat provenant de rates gestantes (80 rates) et 960 embryons de souris provenant de souris gestantes (180 souris) pour la mise en culture des neurones. La miniaturisation des essais nous a permis de limiter fortement le nombre de culture donc d'animaux (réduction). Il est nécessaire pour ces cultures d'obtenir des neurones différenciés, sains et fonctionnels et donc le remplacement par des lignées neuronales n'est pas possible.

- Seuls les composés ayant montré une efficacité neuroprotectrice in vitro sont alors testés in vivo (ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux impliqués dans les tests in vivo, si le test in vitro précédent n'était pas effectué). L'étude des effets de composés sur la mémoire n'est possible que sur l'animal vivant et le remplacement par d'autres méthodes n'est pas possible.

Les phases précoces de la MA sont modélisées chez la souris (C57Bl/6J, lignée de souris classiquement utilisée en neurobiologie) grâce à une injection stéréotaxique unique d'oligomères solubles de peptide A β . Les animaux sont traités par des anti-inflammatoires avant et après la chirurgie stéréotaxique (effectuée sous anesthésie) afin de minimiser la douleur (raffinement). Les animaux exposés à ces oligomères développent des troubles mnésiques, associés à des déficits synaptiques, caractéristiques des phases précoces de la MA. Notre modèle nous permet d'obtenir des réponses rapides et très solides quant aux effets neuroprotecteurs de candidats médicaments pour le traitement et/ou la prévention de la MA. Ce projet de deux ans nécessite 1920 souris pour le test de 40 composés (48 souris pour 1 composé à 1 concentration)

Les avantages des modèles développés (par rapport aux modèles de souris transgéniques classiquement utilisés pour ce genre de développement) sont divers : optimisation du nombre de composés à tester chez l'animal (réduction du nombre de composés potentiellement inactifs et donc d'animaux), optimisation du nombre d'animaux par groupe expérimentaux (réduction) tout en permettant d'obtenir un effet statistique.

Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de pathologies neurodégénératives liées à l'âge (dont la principale est la MA) impacte les sociétés occidentales. La découverte et la validation de thérapie(s) pour la MA est un des enjeux majeurs pour la communauté scientifique (publique et privée).

3800. Le tractus gastro-intestinal est un milieu complexe dans lequel coexistent des cellules épithéliales et immunes de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Le microbiote intestinal est notamment composé de plusieurs milliards de microorganismes qui sont étonnamment bien tolérées par l'hôte. Dans certaines circonstances, la tolérance vis-à-vis du microbiote intestinal est rompue, conduisant à une réponse immune et à une inflammation intestinale ou extra-intestinale. C'est notamment le cas dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) comme la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH).

De grandes études génétiques internationales ont permis d'identifier plusieurs dizaines de gènes associés au risque de MICI. Parmi ces gènes, nombreux sont impliqués dans les interactions avec les microorganismes. Le gène Card9 est l'un d'entre eux et le but du projet est de comprendre son rôle dans les interactions entre le système immunitaire intestinal et le microbiote intestinal en situation basale et au cours de l'inflammation.

Ce projet impliquera l'utilisation d'un effectif maximum de 1440 souris expérimentales pour une durée maximale de 3 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

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