



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

Résumés non techniques des projets autorisés (53)

5301. L'objectif de ce projet est de mieux caractériser l'effet de l'oxaliplatine sur l'audition. L'oxaliplatine est un sel de platine de troisième génération utilisé dans le cadre du traitement du cancer colorectal. Cette molécule entraîne de nombreux effets indésirables, notamment une neuropathie périphérique aigüe ou chronique. Dans l'oreille interne la cochlée est l'organe permettant de coder les sons. Les cellules sensorielles de l'organe de Corti, situé dans la cochlée, transforme le signal sonore en signal électrique et le transmette au ganglion spiral dont les axones se regroupent pour former le nerf cochléaire. Le message nerveux est transmis par ce nerf et remonte jusqu'au cortex auditif. Nous soupçonnons un effet neurotoxique de l'oxaliplatine sur le nerf auditif. En effet, l'oxaliplatine entraîne une neuropathie périphérique aigüe ou chronique qui pourrait également toucher le nerf auditif. De plus, des données cliniques suggèrent que certains patients ayant reçu un traitement d'oxaliplatine ont montré une ototoxicité. Celle-ci était parfois subtile et difficile à détecter, en effet, les patients présentaient un audiogramme normal mais des troubles d'intelligibilité dans le bruit ce qui fait penser à une neuropathie. Il a également été démontré qu'un traitement d'oxaliplatine sur des organes de Corti en culture induisait une dégénérescence des cellules sensorielles de la cochlée. L'étude et la meilleure caractérisation de l'effet de ce médicament chez l'animal sont une nécessité pour envisager par la suite une meilleure prise en charge des patients traités. Pour cela, le traitement de souris CBA/J selon la même procédure qu'en clinique nous permettrait de disposer d'un modèle animal stable représentant la pathologie. En effet, la souris CBA/J possède un système auditif très proche de celui de l'homme ainsi qu'une audition stable dans le temps. Cette étude de l'audition ne peut se faire que sur animal vivant. Nous utiliserons deux groupes de 10 animaux (un groupe contrôle et un groupe de souris traitées), soit 20 animaux. Nous utilisons le minimum d'animaux possibles pour avoir des résultats significatifs et prévoir d'éventuelles pertes (présence d'otites d'oreille moyenne qui entraînent une baisse d'audition). Pour évaluer l'audition, nous réalisons des tests fonctionnels sur animal anesthésié. Les tests sont non invasifs et seulement réalisés par l'insertion d'une sonde dans l'oreille et d'électrodes sous la peau. Dès les premiers signes de réveil de l'animal, l'ensemble du matériel est retiré. Tous les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien et tout signe de souffrance entraînera l'écartement de l'animal concerné de l'étude.

5302. Le cancer du sein représente le 1er cancer chez la femme en France. En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer du sein était estimé à 48 763 cas avec un âge moyen au diagnostic de 63 ans. Les données de mortalité française rapportaient 11 886 décès par an avec un âge moyen au décès de 72 ans. La survie nette des patientes diagnostiquées entre 1989 et 2004 était de 97% à 1 an, 86% à 5 ans et 76% à 10 ans. Le cancer du sein est donc un cancer très fréquent mais qui heureusement bénéficie d'une bonne prise en charge thérapeutique offrant de réelles chances de survie aux patientes.

Après chirurgie, l'utilisation de médicaments antihormones comme le tamoxifène (inhibiteur compétitif du récepteur à l'estradiol) dans le traitement des cancers du sein hormonodépendant a longtemps été le traitement de référence. Aujourd'hui, l'avènement d'inhibiteurs spécifiques de l'aromatase, enzyme transformant les hormones mâles en hormones femelles chez la femme, a modifié la stratégie thérapeutique. Ces agents comprennent l'anastrozole, le létrozole et l'exémestane. De grands essais cliniques randomisés ont montré que ces 3 inhibiteurs d'aromatase, anastrozole, létrozole et exémestane, étaient plus efficaces que le tamoxifène seul pour la prévention des récurrences de cancer du sein, et avec moins d'effets indésirables thrombo-emboliques ou gynécologiques.

Cependant, les inhibiteurs d'aromatase sont responsables de douleurs articulaires (arthralgies) qui altèrent profondément la qualité de vie des patientes. Ces arthralgies sont particulièrement problématiques car très fréquentes et obligent les oncologues à interrompre le traitement par inhibiteurs d'aromatase, alors même que ces traitements sont efficaces et doivent être prolongés jusqu'à 5 ans. Ces arthralgies induites par les inhibiteurs d'aromatase se caractérisent par des douleurs articulaires symétriques (poignets, mains et genoux), l'apparition de syndrome du canal carpien, de raideurs articulaires matinales, de douleurs musculaires et d'une diminution de la force d'agrippement. Ces arthralgies apparaissent après 1,6 mois de traitement (médiane ; min : quelques semaines – max : 10 mois). Les symptômes sont maximaux à 6 mois. Les premières études sur l'emploi des inhibiteurs d'aromatase ont rapporté une prévalence de ces arthralgies iatrogènes proche de 35%. Cependant des études focalisées spécifiquement sur ces arthralgies, et donc avec des critères de mesures plus fins, ont rapporté une prévalence plus élevée avoisinant les 50% des patientes traitées. La prévalence des arthralgies semble être identique entre les 3 inhibiteurs d'aromatase disponibles sur le marché (exémestane, létrozole et anastrozole). Les arthralgies induites par les inhibiteurs d'aromatase sont une préoccupation majeure pour les patientes traitées, ayant des répercussions délétères sur la vie au quotidien telles qu'une diminution des activités physiques, de la fatigue et une altération de la qualité de vie. Si bien même que jusqu'à 11% des patientes arrêtent leur traitement à cause de ces arthralgies. La physiopathologie de ces arthralgies induites par les inhibiteurs d'aromatase n'est pas clairement élucidée et la principale hypothèse proposée serait la carence estrogénique et probablement la soudaine chute des

estrogènes. Associé à la carence estrogénique, la piste de l'induction d'un syndrome inflammatoire a aussi été évoquée pour expliquer ces arthralgies. Il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle animal reproduisant la symptomatologie clinique permettant d'étudier la physiopathologie et la sensibilité aux antalgiques de ces arthralgies iatrogènes. Dans ce contexte, il serait essentiel de pouvoir proposer un nouveau modèle animal qui permettrait de comprendre les mécanismes physiopathologiques de ces arthralgies et de proposer en fine de nouvelles stratégies thérapeutiques reposant sur des bases pharmacologiques validées.

L'objectif de ce projet d'étude non-clinique est de créer un modèle animal reproduisant les arthralgies induites par les inhibiteurs d'aromatase, chez des rats femelles castrées pour reproduire la ménopause de la femme (N= 60 animaux pour une expérimentation complète). Ensuite sur la base de ce nouveau modèle animal, il sera possible d'étudier la physiopathologie de ces arthralgies et de proposer des pistes de prise en charge thérapeutique.

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en œuvre pour appliquer la réduction et le raffinement de la règle des 3R (le remplacement est traité ci-dessus). Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum en travaillant avec des blocs de 4 animaux éventuellement répété 2 fois maximum. Le choix de l'espèce de rat est justifié au regard de la taille de l'animal pour une chirurgie plus simple et des qualités comportementales autorisant une exploration fine du comportement animal. Le choix de castrer les animaux est fait pour assurer les meilleures conditions possibles pour une extrapolation des résultats à l'homme (femmes ménopausées). Enfin, tous les efforts seront faits pour limiter le stress et les douleurs des animaux.

5303. Il est évident aujourd'hui que le système immunitaire a un rôle prépondérant dans diverses pathologies. Outre son rôle principal de défendre l'hôte contre différentes agressions extérieures, telles que les bactéries ou les virus, il est capable dans certaines situations de se retourner contre l'hôte et d'entraîner une inflammation chronique comme dans la maladie de Crohn ou le lupus érythémateux voire la destruction d'un organe dans le pire des cas comme dans le diabète de type I ou la sclérose en plaque. Celui-ci est également l'élément essentiel de la destruction de cellules devenues anormales mais c'est aussi en partie lui le responsable de l'échappement tumoral.

Ces dernières années, la compréhension des différents acteurs d'une réponse inflammatoire que ce soit dans le cas d'auto-immunité, de rejet d'organes, ou de réponse anti-tumorale a mis en lumière l'équilibre entre l'activation et l'inhibition de cette réponse. Cet équilibre est maintenu par des populations effectrices telles que les lymphocytes T, les lymphocytes B ou encore les cellules NK qui sont surreprésentées dans les maladies auto-immunes ou les rejets de greffe et des populations régulatrices telles que les lymphocytes régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives, principaux médiateurs du développement tumoral et de la rechute dans le cas du cancer.

Les traitements d'immunothérapie actuels visent à contrebalancer cet équilibre. Dans le cas du cancer, les traitements cherchent à améliorer l'action des cellules effectrices ainsi qu'à inhiber la fonction des cellules régulatrices. Dans le cas de l'auto-immunité, les maladies inflammatoires chroniques ou encore le rejet de greffe, c'est l'exact opposé. Ces traitements de plus en plus ciblés visent des gènes spécifiques de l'immunité sur l'une ou l'autre catégorie des populations immunitaires avec pour effet de moduler la réponse immune. Dans le cas du cancer, les voies CTLA-4/B-7 ou encore PD-1/PD-L1 ont eu de très bons résultats en essais cliniques. Dans le cas des maladies inflammatoires chroniques, les anticorps anti-TNFalpha ont donné de bons résultats. Ces essais ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins. Malgré ces avancées, les rechutes sont encore trop nombreuses et il est essentiel de chercher d'autres molécules et d'autres combinaisons.

Dans notre laboratoire, nous avons identifié une nouvelle cible immunitaire exprimée par les cellules d'origine myéloïde comme les monocytes, macrophages ou encore les cellules myéloïdes suppressives et pour laquelle il existe une souris déficiente pour ce gène : le gène SIRPa. Nous avons d'ores et déjà testé un traitement ciblant ce gène dans deux modèles de cancer en combinaison à d'autres traitements ciblant le système immunitaire Cette première étude nous a permis de démontrer l'efficacité thérapeutique de ce traitement en combinaison dans au moins un des modèles et d'identifier les médiateurs cellulaires impliqués dans cette efficacité. Nous avons aussi pu démontrer que l'effet de notre traitement était similaire à celui observé chez la souris mutante.

Dans cette nouvelle étude, nous souhaiterions dans un premier temps tester l'efficacité de notre traitement dans d'autres modèles tumoraux chez la souris, étape indispensable avant de pouvoir tester un traitement en clinique, notamment car chaque cancer est différent. De plus, parce que SIRPa a un rôle important sur les cellules myéloïdes et au vu des effets observés dans la première étude, nous souhaiterions étudier son implication dans d'autres pathologies inflammatoires autre que le cancer. La souris mutante pour SIRPa est ici un moyen important de démontrer scientifiquement l'efficacité du traitement SIRPa d'une autre manière.

Le nombre d'animaux utilisé sera de 3030 souris (réparties dans 7 modèles différents, selon 4 axes par modèles, et 3 à 6 groupes par axe) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Selon les modèles proposés, le nombre d'axes par modèle pourra être diminué selon les résultats de l'axe précédent, réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisés. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfourer et se cacher.

5304. La tolérance de l'individu aux chocs a surtout été étudiée dans l'industrie automobile. Outre les problèmes liés à la sécurité routière, un autre aspect à prendre en compte est le côté défense. Les conflits militaires récents et les actions terroristes qui se multiplient à travers le monde, notamment récemment en France, confirment un changement radical dans la nature des menaces et leur mode d'action. Aujourd'hui le contexte de la « double-menace » (balistique et blast) dans les conflits est traité de front afin de dégager les points critiques et les paramètres clefs à prendre en compte pour l'évolution et la mise en œuvre d'équipements individuels de protection toujours plus efficaces.

Le projet REELTHOR vise à développer des modèles biomécaniques des tissus biologiques tels que le poumon initialement du porc et ensuite de l'homme afin de pouvoir modéliser numériquement les organes. L'objectif est de pouvoir prédire les risques lésionnels thoraciques encourus face à une menace identifiée et d'évaluer le comportement de la protection individuelle vis-à-vis de celle-ci afin de limiter ces risques. Afin de développer le modèle biomécanique, il est nécessaire de connaître les propriétés intrinsèques du « matériau biologique » afin de définir la loi de comportement mécanique des organes considérés.

Cette définition de « loi de comportement » est considérée comme un jalon essentiel pour le développement d'outils pour la simulation numérique visant à modéliser le corps humain en situation de choc.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

**Remplacement** : Il n'y a pas de méthode alternative, le recours à l'animal est nécessaire. Le Porc est un modèle de choix, car son anatomie pulmonaire est similaire à celle de l'Homme.

**Réduction** : l'étude REELTHOR nécessitera de l'utilisation de 8 sujets expérimentaux au total. Les 8 cochons seront soumis à des tests mini-invasifs et invasifs. Les cochons seront sacrifiés par injection d'une dose létale de Chlorure de Potassium sous anesthésie générale selon notre protocole de mise à mort. Il y a pas de données dans la littérature permettant un calcul de l'échantillon a priori. L'utilisation de 8 cochons (dont chaque cochon est son propre témoin) devrait être suffisante pour obtenir des résultats satisfaisants.

**Raffinement** : l'étude REELTHOR prévoit une phase de test durant laquelle il n'y aura pas de survie du sujet expérimental. Néanmoins l'angoisse liée au déplacement de la cage à la plateforme d'imagerie sera contrôlée par une injection intramusculaire de ketamine (20mg/kg) + azaperone (2mg/kg) (Stresnil ; Janssen-Cilag, Belgium) 10 minutes avant la procédure. Ensuite l'induction sera pratiquée avec injection intraveineuse de Propofol (3mg/kg) + rocuronium (0.8mg/kg). L'anesthésie sera maintenue avec de l'isoflurane 2%.

5305. En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires.

En France, le cancer provoque environ 33% des décès chez les hommes et 23% chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests in-vitro sont systématiquement mis en place sur des modèles cellulaires humains reconstruits, mimant artificiellement la pathologie de l'homme.

Grâce à ces tests in-vitro, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles in-vivo de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. C'est en effet dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse.

Ce projet s'inscrit dans un programme de recherche de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses. Son objectif est de maintenir une banque de tumeurs d'origine humaine ou murine chez la souris afin de disposer d'un matériel tumoral suffisant pour réaliser des études pharmacologiques destinées à tester de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.

Il s'agit d'un projet dédié uniquement à l'amplification et au maintien de tumeurs « in-vivo », essentiellement pour les tumeurs issues de patients mais également pour certaines lignées tumorales issues de banques commerciales dont les caractéristiques de croissance limitent leur maintien « in-vitro ».

Pour ce faire, des fragments de tumeurs issus de prélèvements de patients ou de banques de cellules tumorales d'origine humaines ou murines sont implantés sous la peau de souris et maintenus en croissance jusqu'à atteindre une taille suffisante (mais inférieure aux points limites éthiques fixées). Les tumeurs ainsi formées sont ensuite prélevées puis sectionnées en plusieurs fragments et greffées à de nouvelles souris :

- à la fois, pour réaliser une étude pharmacologique visant à tester un traitement,
- mais également, pour maintenir la banque de tumeurs in-vivo pour qu'elle soit disponible et mobilisable à tout moment pour réaliser d'autres études pharmacologiques.

Les greffes sont systématiquement réalisées en présence d'analgésie et peuvent parfois faire l'objet d'une anesthésie générale fonction de la méthode de greffe employée.

L'état général des souris et la taille des tumeurs sont surveillés régulièrement pour identifier les éventuels signes de souffrance et appliquer les points limites prédéfinis si nécessaire. Dans le cadre de ce projet, les tumeurs ne sont maintenues qu'à des volumes faibles et surtout bien inférieurs aux volumes constituant un point limite.

Tout au long de l'étude, les souris sont logées en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de « cocoon », est apporté de manière à favoriser leur instinct de nidification. Cet enrichissement va également permettre de surveiller leur état général par leur comportement vis-à-vis de cet enrichissement.

Compte tenu du nombre de tumeurs ou de lignées tumorales nécessitant ce type d'amplification in-vivo, on estime à 1500 le nombre de souris nécessaire pour ce projet sur 5 ans.

5306. Le cancer du sein (CS) est le cancer le plus fréquent chez la femme. Bien que les programmes de prévention et de dépistage, ainsi que les traitements ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses ont permis de réduire la mortalité liée au cancer, le CS reste la première cause de décès par cancer chez la femme, avec 12665 cas en 2015 (EUCAN, iarc). Sans amélioration dans la prise en charge du CS, le taux de mortalité lié au CS aura augmenté de 17% en 2030. Cela sera en partie dû à

l'augmentation de la population vieillissante. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc primordiale pour faire face à ce problème majeur de santé publique.

La considération du microenvironnement dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est une option prometteuse, et plus particulièrement le microenvironnement immunitaire. Au cours des dernières années, certaines thérapies ciblant le système immunitaire ont déjà démontré des efficacités thérapeutiques sans précédent dans certains types de cancer. Cependant, à l'heure d'aujourd'hui, seulement un faible nombre de patients répondent à ces thérapies innovantes. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le microenvironnement immunitaire des patientes atteintes de CS s'avère être primordiale, et tout particulièrement les neutrophiles associé aux tumeurs (TAN en anglais), qui ont récemment émergés comme la population immunitaire ayant l'impact le plus néfaste sur la survie des patients atteints de CS. Alors que le rôle tumoral des TAN semble bien établi dans des tumeurs avancées, des évidences proposent un rôle anti-tumoral des TAN aux étapes précoces de la tumorigenèse, suggérant un rôle différentiel et une plasticité fonctionnelle des TAN suivant le stade de développement (précoce ou avancé) de la tumeur. Notre projet de recherche a pour objectif d'identifier et comparer, dans un modèle préclinique murin, les mécanismes anti-tumoraux et pro-tumoraux des TAN aux différents stades de la tumorigenèse mammaire.

Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie : ce projet innovant devrait permettre non seulement d'identifier de nouveaux biomarqueurs spécifiques des neutrophiles anti-tumoraux, mais également d'identifier des cibles thérapeutiques pour restaurer l'action anti-tumorale des neutrophiles dans les tumeurs avancées chez l'homme.

Conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement et nombre total d'animaux inclus dans ce projet. Seul un modèle préclinique in vivo chez la souris permet d'étudier le rôle des neutrophiles aux différentes étapes de la progression tumorale. De plus, des approches de déplétion par anticorps des neutrophiles proposées dans ce projet ne sont pas possibles chez l'homme. De la même manière, la validation des cibles thérapeutiques potentielles se verra d'abord être testée chez la souris comme modèle préclinique avant de les appliquer à l'homme. Le nombre maximal de souris utilisées dans ce projet (n=344) a été réduit au minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et reproductibles. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par des personnels compétents avec mise en place de mesures antalgiques appropriées permettra de limiter au maximum toute souffrance animale.

5307. Certaines malformations cardiaques congénitales ainsi que l'hypertension artérielle pulmonaire (maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons) se compliquent d'un mauvais fonctionnement (insuffisance) du ventricule droit qui souffre de façon chronique et prolongée d'un excès de charge en pression et/ou en volume. Cette insuffisance cardiaque droite conduit au décès prématuré d'adultes encore jeune, le traitement de cette maladie étant peu satisfaisant avec une surmortalité de 7.5% chez les 20-30 ans. Ainsi, la découverte de nouveaux traitements apparait primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie.

Récemment, la thérapie cellulaire a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques en cardiologie et des études expérimentales puis cliniques ont prouvé son efficacité pour améliorer la contraction du muscle cardiaque après un infarctus du myocarde. Cependant, aucune étude n'a été menée sur le ventricule droit défaillant. Avant de tester cette thérapie prometteuse chez les patients, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche, le devenir des cellules implantées et l'efficacité de la thérapie cellulaire sur un modèle animal. Concernant les maladies cardiovasculaires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine du fait de l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques cardiovasculaires comparables à celles de l'Homme. Avant de débiter cette étude, des expériences sur des cellules puis sur des modèles de rongeurs ont été effectuées afin de réaliser la preuve de concept.

Des études préliminaires sur un modèle porcin reproduisant une cardiopathie congénitale réparée parmi les plus fréquentes, la tétralogie de Fallot, ont été encourageantes, montrant un effet bénéfique de la thérapie cellulaire sur l'insuffisance cardiaque droite. Mais les résultats sont encore insuffisants en partie en raison des modalités d'administration. Dans ce projet utilisant le même modèle, les cellules souches seront appliquées sur la totalité du ventricule droit au moyen d'un patch fabriqué par bio-impression 3D après « moulage » du ventricule droit par imagerie scanner. Une surface plus grande du ventricule droit sera ainsi traitée dans l'espoir d'une amélioration plus importante de sa contractilité. Le projet de recherche sera mené par une équipe multidisciplinaire de spécialistes impliquant des chirurgiens cardiaques congénitaux et des cardiopédiatres afin de favoriser les procédures non invasives (échographie cardiaque, ECG), d'optimiser tous les gestes invasifs (chirurgie, cathétérisme cardiaque, scanner cardiaque) et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Pour la totalité du projet, nous utiliserons au maximum 18 animaux. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m<sup>2</sup> (individus de poids <50kg) avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure).

5308. Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau d'origine inconnue et non contagieuse, affection dermatologique qui touche 2 à 3 % de la population mondiale, atteignant de manière équivalente les hommes et les femmes.

Le psoriasis en plaques, appelé également psoriasis vulgaris, est la forme la plus courante du psoriasis (plus de 90 % des cas). Dans sa forme bénigne et typique, le psoriasis se caractérise par des lésions rouges et squameuses du cuir chevelu, des genoux et des coudes, associées à une atteinte des ongles. Dans les cas graves, l'atteinte cutanée peut être généralisée (érythrodermie) et il peut exister des atteintes des articulations. Cette dermatose évolue de façon chronique avec des poussées entrecoupées de périodes de rémissions de durée variable au cours desquelles les lésions sont minimales. Aucun traitement permettant la guérison n'est connu.

; le traitement proposé permet uniquement de contrôler l'évolution de la maladie, en permettant la régression transitoire plus ou moins complète des lésions. Le traitement est adapté en fonction de la gravité et du retentissement sur la qualité de vie des patients.

Les causes précises du psoriasis sont inconnues bien que, dans près de 30 % des cas, une prédisposition familiale existe, surtout si des facteurs externes viennent se rajouter. L'épiderme se renouvelle trop rapidement, en seulement quatre à six jours, au lieu des trois semaines habituelles ce qui engendre des inflammations localisées. Les cellules épidermiques s'accumulent à la surface de la peau et forment une couche de pellicules blanches appelées squames. Parfaitement inoffensives, celles-ci ont pourtant le désavantage d'être inesthétiques.

Le but de ce projet est d'étudier les effets du composé HS050117, composé naturel modifié chimiquement, sur le traitement de psoriasis induit chez la souris BALB/c. Nous utiliserons 56 souris femelles BALB/c âgées de 6 semaines pour ce projet. Les 56 souris BALB/c seront réparties en 7 groupes de 8 souris avec 1 groupe sans induction de psoriasis traité avec une pommade neutre (SIP-PN) et 6 groupes avec induction de psoriasis traités respectivement avec une pommade neutre (AIP-PN), avec une pommade contenant 1.00% de composé HS050117 (AIP-HS/1.00%), avec une pommade contenant 0.50% de composé HS050117 (AIP-HS/0.50%), avec une pommade contenant 0.10% de composé HS050117 (AIP-HS/0.10%), avec une pommade contenant 0.05% de composé HS050117 (AIP-HS/0.05%) et avec la crème Dermoval® contenant 0.05% de clobétasol (AIP-Dermoval), référence pharmaceutique utilisé pour le traitement du psoriasis chez l'Homme. Les procédures appliquées seront a) le rasage des poils sous anesthésie gazeuse, b) l'application cutanée pendant 10 jours (J1 à J10) d'une pommade contenant de l'Imiquimod, agent inducteur de psoriasis, pour les groupes AIP et d'une pommade neutre pour les groupes SIP, c) traitement des animaux par application cutanée des différentes pommades et crème testées pendant 4 jours (J7 à J10), d) l'évaluation comportementale de animaux dans un champ ouvert (open-field) pendant 10 minutes 24 heures après le dernier traitement (J11) avec enregistrement vidéo (vidéo-tracking) pour la quantification de différents paramètres, e) un prélèvement de sang avant l'euthanasie des animaux pour le dosage de biomarqueurs (J11). Des analyses histologiques seront également effectuées sur des prélèvements cutanés effectués sur l'ensemble des animaux.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser l'évaluation comportementale pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles in vitro permettant l'évaluation comportementale de composés (Remplacement) mais nous utiliserons le nombre minimum d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon notre expérience de ce modèle de psoriasis et dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Des observations quotidiennes seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20%, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entrainera la sortie d'étude et la mise à mort des animaux selon les recommandations éthiques.

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence du psoriasis dans la population européenne et mondiale, le développement de ce modèle d'étude permettant ensuite d'évaluer des composés en développement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des traitements efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

5309. En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, cette pathologie provoque environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales qui ont acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme et prolifèrent indéfiniment pour former une tumeur maligne et/ou des métastases.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests in-vitro sont systématiquement mis en place sur des cellules en culture, mimant artificiellement la pathologie de l'homme.

Grâce à ces tests in-vitro, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles in-vivo de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. C'est en effet dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse.

Pour pouvoir effectuer ces évaluations in-vivo, il est indispensable d'utiliser en premier lieu un modèle tumoral maîtrisé et bien caractérisé en recréant la pathologie par implantation de cellules tumorales ou de fragments tumoraux chez la souris. L'animal porteur de tumeur devient ainsi un bon modèle expérimental pour évaluer les composés anti-cancéreux.

Ce projet va ainsi consister à déterminer les conditions optimales de greffe de tumeurs et leurs caractéristiques de croissance tumorale afin de disposer de modèles fiables et robustes utilisables pour la sélection de candidats médicaments. Ces modèles de souris greffées par des tumeurs doivent au préalable être mis au point et caractérisés pour chaque tumeur qui va être étudiée (tumeurs d'origine humaine ou de souris). La greffe de tumeurs d'origine humaine nécessite que la souris ait un système immunitaire très réduit afin d'éviter les réactions de rejet. Les souches de souris utilisées présentent donc toutes un déficit dans leur système immunitaire (elles sont dites immunodéprimées) et de ce fait présentent une grande sensibilité à tous les agents pathogènes classiquement rencontrés dans notre environnement de tous les jours. Elles nécessitent d'être hébergées dans un secteur dit protégé afin de les préserver de tout risque infectieux provenant de l'environnement extérieur.

Une pré-sélection des conditions expérimentales à tester est réalisée avant le démarrage des études par une phase préalable de recherche bibliographique pour chacune des lignées tumorales à étudier. Sur la base de ces informations, différentes concentrations cellulaires de cellules tumorales ou de fragments tumoraux sont injectées en voie sous-cutanée, intradermique ou en intra-mammaire à des souris et la croissance tumorale est ensuite suivie au cours du temps.

Deux techniques d'évaluation de la croissance tumorale peuvent être employées : par pied à coulisse ou par imagerie optique (bioluminescence). Ces 2 techniques, non invasives pour l'animal, présentent chacune leurs avantages et seront choisies en fonction des besoins expérimentaux. Le pied à coulisse permet ainsi une mesure rapide du volume de la tumeur chez l'animal éveillé. La bioluminescence permet une détection plus précoce des tumeurs ainsi qu'une détection de la prolifération métastatique pour certains types de tumeurs mais nécessite une anesthésie de la souris pendant la durée d'acquisition des données. Elles permettent toutes deux d'effectuer des mesures non douloureuses pour l'animal et de suivre l'évolution des tumeurs au cours du temps, ceci concourant à la réduction du nombre de souris nécessaires dans une même étude.

L'état général des souris est surveillé régulièrement et les volumes tumoraux sont mesurés au moins 2 à 3 fois/semaine, à la fois pour l'objectif de l'étude mais également pour identifier les éventuels signes de souffrance et appliquer les points limites prédéfinis si nécessaire. Tout au long de l'étude, les souris sont logées en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de tubes de coton à décortiquer est apporté de manière à favoriser leur instinct de nidification.

Ces études vont permettre de déterminer les meilleures conditions de greffe sur la base des nombreux paramètres qui vont pouvoir être recueillis comme la vitesse de croissance tumorale, le pourcentage de prise tumorale, mais également le relevé des signes cliniques. Cette étape est primordiale puisqu'elle va permettre d'adapter en conséquence le nombre de souris à greffer pour la conduite des études de pharmacologie ultérieures en assurant la réussite de la greffe.

Compte tenu du nombre de lignées tumorales pouvant être étudiées sur 5 ans, on estime à 4200 le nombre de souris nécessaire pour ce projet. Ce nombre permettra de mettre au point 14 modèles de tumeurs en moyenne par an.

5310. Le point de départ du développement d'un cancer est l'altération du matériel génétique d'une des cellules de l'organisme. Cette altération entraîne un dysfonctionnement des cellules qui, progressivement, perdent le contrôle de leur prolifération, deviennent immortelles et se développent de façon anarchique dans l'organisme. D'autre part, pour combattre les agressions extérieures (infection virale ou bactérienne) l'organisme se défend en activant son système immunitaire grâce à la mobilisation de plusieurs types de cellules et la production de molécules de défense. Suite à ces deux faits, le concept d'immunothérapie est né, c'est-à-dire traiter le cancer en utilisant le système immunitaire. Le cancer n'est plus vu uniquement comme une maladie des gènes mais aussi comme une maladie de l'organisme, de l'environnement de la tumeur et du système immunitaire. Très schématiquement, l'immunothérapie peut se résumer à deux pistes :

- 1) si le système immunitaire ne reconnaît pas la tumeur comme étrangère à l'organisme, il va falloir induire une réponse en l'éduquant, c'est-à-dire en lui apprenant à la reconnaître comme dangereuse.
- 2) si la réponse est présente, mais pas assez forte, il s'agira alors de la stimuler, pour lui donner une dimension qui soit à la hauteur de son adversaire.

Le but de cette étude est d'induire une réponse immune grâce à l'injection d'une protéine P qui serait capable d'induire une « auto-vaccination » contre les tumeurs. Des données préliminaires, in vitro, suggèrent que cette protéine possède un mécanisme d'action innovant puisqu'elle agit comme un agent immunostimulant qui cible les cellules dendritiques du système immunitaire et induit leur activation/maturation.

L'ensemble de ce protocole a été rédigé en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisant et en suivant des règles éthiques strictes dans le but de garantir le bien-être animal, avec la mise en place de mesures antalgiques appropriées.

Ce protocole prévoit l'utilisation au maximum de 480 souris.

5311. La sclérodémie (ScS) est une maladie systémique caractérisée par une fibrose cutanée et des anomalies de la microcirculation sanguine notamment un phénomène de Raynaud, très souvent inaugural. Il s'agit d'une maladie rare, qui appartient au groupe des maladies orphelines. Son incidence varie entre 2 et 16 cas par million de sujets par an, et sa prévalence de 3 à 30 pour 100 000 habitants. Elle est 4 fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme, et débute le plus souvent entre 30 et 50 ans. L'expression clinique et la gravité de cette maladie sont très variables. L'étendue de la fibrose cutanée peut se limiter à une atteinte des extrémités dans les formes cutanées limitées ou remonter au-dessus des coudes et des genoux dans les formes diffuses. Elle peut se compliquer d'une fibrose pulmonaire, d'une hypertension artérielle pulmonaire, d'une crise rénale, d'une atteinte de la partie inférieure du tube digestif et/ou d'une atteinte cardiaque. Ces manifestations viscérales sont associées à une diminution de la survie. Il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour cette maladie. Les atteintes rénales sont maintenant limitées grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Les causes de décès sont aujourd'hui essentiellement cardio-pulmonaires, et l'espérance de vie globale est d'environ 70% à 5 ans.

La ScS demeure une affection d'étiologie inconnue, et les facteurs à l'origine du dysfonctionnement des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire restent à préciser.

Notre projet a pour but d'explorer les processus inflammatoires impliqués dans la ScS et de déterminer les molécules anti-inflammatoires potentiellement actives pour diminuer cette pathologie. Ainsi l'étude in vivo de molécules, testées au préalable in vitro, nous permettra d'obtenir de nouvelles pistes physiopathologiques et d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques, nécessaires dans cette maladie dont la progression est peu freinée par les traitements actuels.

Nous déterminerons si des molécules anti-inflammatoires ont un effet protecteur dans deux modèles murins de ScS.

Des expériences préliminaires seront réalisées *in vitro* sur des fibroblastes en culture et de lignées cellulaires de neurones. Des modulateurs de l'inflammation seront testés sur ces cellules, afin de sélectionner les molécules ayant le plus d'intérêt pour minimiser le nombre de souris utilisées par la suite. De plus, afin de définir et d'optimiser les paramètres d'injection et de réduire, in fine, le nombre d'animaux nous réaliserons un test de dose préliminaire (n=224). Cette première procédure conduira à optimiser les modalités thérapeutiques *in vivo*.

Le premier modèle de ScS sera réalisé par injection sous-cutanée d'HOCl, selon un protocole bien établi au laboratoire (n=160). Le second modèle de ScS est décrit dans la littérature et déjà utilisé au laboratoire. Il sera réalisé par injection sous-cutanée de bléomycine (n=160). Toutes ces souris (n=320) seront traitées avec les molécules anti-inflammatoires sélectionnées, puis nous mesurerons l'évolution de la sclérodémie.

Un suivi quotidien des souris (n total = 544) nous permettra d'évaluer les effets de molécule anti-inflammatoire sur la ScS et de déterminer les mécanismes impliqués dans le développement de la ScS, tout en contrôlant le bien-être, l'état général des animaux et l'atteinte éventuelle des points limites. Tous les gestes ou prélèvements sur les animaux sont réalisés sous anesthésie gazeuse. Ce travail important devrait permettre de développer des traitements efficaces permettant de lutter contre le processus de fibrose dans la ScS.

5312. Le Glaucome est l'une des principales causes de déficit visuel lié à l'âge et au diabète. A l'horizon 2020, 80 millions de personnes en seront atteintes. Cette maladie se caractérise par la dégénérescence des fibres nerveuses qui composent le nerf optique et la mort des neurones rétiniens à l'origine de ces fibres. Nous nous proposons de tester de nouvelles biomolécules développées dans notre laboratoire pour leur capacité à protéger les neurones rétiniens de la mort, dans un modèle expérimental de Glaucome. Ces peptides ont déjà fait la preuve de leur efficacité *in vitro* : ils favorisent l'élongation des prolongements qui permettent les connections entre neurones, et stimulent la régénération de ces prolongements, après section. Nous devons à présent apporter la preuve de l'efficacité de ces neuropeptides dans un contexte lésionnel plus proche de la clinique.

Le modèle de Glaucome que nous utiliserons sera obtenu par pincement intra-orbital calibré du nerf optique de souris sous anesthésie générale. Cette technique est non invasive, la peau n'est pas incisée, le nerf n'est pas coupé mais les fibres nerveuses qui le composent vont dégénérer et provoquer la mort des neurones rétiniens. Le pincement du nerf sera unilatéral afin de préserver les fonctions visuelles. Les souris dont le nerf optique aura été pincé recevront des injections d'analgésiques et leur état général sera contrôlé régulièrement. Les biomolécules à tester seront délivrées au niveau de la rétine par une injection intraoculaire sous anesthésie générale. L'intégrité de l'œil et notamment de la lentille, ainsi que les vaisseaux sanguins et les faisceaux musculaires seront préservés. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Les animaux seront euthanasiés entre 1 jour et 12 semaines après le pincement du nerf.

Pour mener à bien nos objectifs, un maximum de 354 souris âgées de neuf semaines sera nécessaire. Cette estimation tient compte des exigences statistiques et des contrôles nécessaires à la validation de nos substances actives. Nous avons choisi le modèle souris pour sa taille et son anatomie, particulièrement adaptées à la chirurgie ophtalmique. De plus, une lignée de souris transgénique existante sera utilisée dans certains essais. La bonne maîtrise des gestes chirurgicaux et une hygiène rigoureuse lors des chirurgies sont indispensables au maintien du bon état général des souris. De plus, mâles et femelles seront hébergés (séparément) par groupe de 6 individus et leur environnement sera enrichi de matériaux de nidification. Si malgré ces précautions l'état d'un animal opéré venait à se dégrader, il sera euthanasié.

Le but ultime de ce projet est de proposer un traitement pour prévenir les processus neurodégénératifs responsables de rétinopathies, et d'élargir cette application thérapeutique à d'autres formes de neuro-dégénérescence.

5313. Depuis 2009, les agonistes de PPARbeta/delta sont inscrits sur la liste des produits interdits de l'agence Mondiale Antidopage en tant que modulateurs métaboliques car une "sur-activation" de la voie PPARbeta peut améliorer "artificiellement" la performance d'endurance. Les protocoles présentés ont pour but d'améliorer la détection de l'utilisation de substances dopantes modulatrices du métabolisme qui activent la voie PPARbeta. Avec ce projet, nous souhaitons donc valider l'utilisation d'une ou plusieurs propriétés des cellules T comme signature de dopage avec des substances qui sur-activent la voie PPARbeta. Nous espérons ainsi démontrer qu'il est possible de dissocier les changements des propriétés des cellules T induites par des substances qui « sur-activent » la voie PPARbeta des effets potentiellement induits par l'exercice aigu et l'entraînement. A terme, ce travail pourrait permettre de mettre au point un mode de détection pour lutter contre cette stratégie de dopage. 120 souris C57B16 males sont nécessaires pour cette étude. Nous traiterons une partie des souris par l'agoniste spécifique de PPARbeta (GW0742) par voie orale (supplémentation de l'alimentation) et une partie des souris sera entraînée sur tapis roulant pendant 8 semaines. Des tests d'évaluation des capacités physiques (tests de force (agrippement) et d'endurance (course tapis roulant)) seront réalisés aux différentes étapes du protocole. Il n'est pas possible d'effectuer cette étude chez l'homme car la molécule ciblée n'est pas autorisée à être commercialisée sous forme de médicament. De plus, du fait de l'objet de l'étude qui consiste à détecter une prise d'agents activateurs de la voie PPARbeta dans des cellules sanguines, le modèle animal apparaît être le modèle le plus approprié. Pour satisfaire au principe de réduction, nous prévoyons d'utiliser le minimum de souris requis pour notre étude permettant l'analyse statistique. Pour satisfaire au principe de raffinement, nous réaliserons un suivi régulier des souris. Elles disposeront par ailleurs d'un environnement enrichi. Les procédures présentées ici (exercice, entraînement, nourriture enrichie) ne sont ni des procédures stressantes ni des procédures douloureuses. Les biomarqueurs sanguins de l'activation de la voie PPARbeta identifiés dans cette étude, pourront améliorer la détection d'une sur-activation de cette voie par des molécules "dopantes" mais, plus globalement, permettront la détection de pathologies dans lesquelles l'activation de la voie PPARbeta est affectée (ex: diabète de type 2, maladies neurodégénératives).

5314. L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des mélanges glucidiques visant à l'amélioration de la régulation glycémique chez l'humain en les substituant au glucose présent dans certains aliments. La cible visée par les mélanges glucidiques est la population générale, chez laquelle ils devraient permettre de réduire l'index glycémique (comparativement au glucose) et ainsi, de diminuer les apports en glucides lorsque les mélanges seront incorporés à des aliments de consommation courante en remplacement du glucose. L'étude permettra de réaliser une première preuve de concept de l'efficacité de ces mélanges chez un modèle animal sain.

L'objectif de l'étude sera d'évaluer l'impact de 3 mélanges glucidiques (la composition des mélanges est gardée confidentielle pour des raisons contractuelles) sur la variation de glycémie mesurée après administration orale des mélanges par un test de tolérance oral. Les résultats obtenus seront comparés à ceux obtenus après une administration d'une solution de glucose 30%.

Un total de 28 souris sera utilisé, divisé en 4 groupes de 7 animaux:

- Un groupe traité avec une solution de glucose (groupe contrôle)
- 3 groupes traités avec une solution réalisée avec l'un des mélanges glucidiques à tester (mélanges A à C).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- Raffinement: Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de divers composés pharmaceutiques ou agroalimentaires sur le contrôle glycémique. Il s'agit d'un modèle de souris "saine", qui correspond à la cible humaine visée. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (3-4 animaux par cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de petites « mouse-house ». Enfin, bien que le protocole soit relativement peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe a été pensé de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'efficacité réelle d'un composé sur l'index glycémique.

5315. Les escarres sont des lésions d'origine ischémique, au niveau des saillies osseuses, induites par la compression des tissus mous. Cette pathologie est associée à un grand nombre de comorbidités, comme le diabète, la paraplégie, la démence... Aujourd'hui, on estime qu'un patient porteur d'escarres a 3,6 fois plus de risque de mourir qu'un patient sans escarre. Cette pathologie relève aujourd'hui d'une problématique de santé publique avec un taux d'incidence variant dans les unités de soins intensifs entre 10 et 41%. Le traitement des escarres peut être très long (parfois plusieurs années) et le risque de développer de nouvelles escarres pendant la convalescence est élevé. Aussi la prévention reste aujourd'hui le meilleur traitement. Or les causes de la pathologie sont méconnues, plusieurs hypothèses sont étudiées mais les mécanismes cellulaires initiaux n'ont toujours pas été identifiés.

La prévention des escarres repose sur la mobilisation des points d'appui du patient toutes les deux ou trois heures. Cette manœuvre peut potentiellement créer un phénomène d'ischémie reperfusion. Les tissus mous sont comprimés, entraînant une diminution de l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules. Lorsque la vascularisation est rétablie, les cellules peuvent être endommagées par le flux massif d'oxygène, bloqué par la compression. On parle d'hyperémie réactive et de déséquilibre de la balance redox. Or le stress oxydant généré dans les cellules est susceptible de faire fluctuer nos réserves en calcium (Ca<sup>2+</sup>) qui jouent un rôle essentiel dans la contraction musculaire. Cette modification précoce de l'homéostasie calcique pourrait être responsable d'apoptose et de nécrose cellulaire qui viendrait entretenir une inflammation chronique autour des points d'appui et qui générerait le développement ou l'évolution néfaste d'une escarre.

La partie expérimentale de l'étude est basée sur l'utilisation de souris (nombre estimé : 78 animaux sur 3 ans). Nous respecterons le principe des 3 R. Si une alternative est identifiée pendant la réalisation de nos travaux, nous Remplacerons notre stratégie immédiatement. Nous avons organisé nos expériences au mieux pour Réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition des données (identifier une intensité de pression pertinente pour limiter les groupes dans une seconde partie ; utilisation d'une zone comprimée pour que chaque animal soit son propre contrôle et éviter l'utilisation d'un groupe témoin). Nous avons Raffiné nos approches pour réduire au strict minimum la détresse imposée à ces animaux, avec la mise en place de mesures antalgiques appropriées, et pour apprécier au mieux les points limites.

5316. La maladie d'Alzheimer est la principale maladie de démence neurodégénérative. Cette maladie touche 10 % de la population mondiale de plus de 65 ans et environ 40% de la population mondiale de plus de 80 ans. En France, on estime que plus d'un million de personnes seront atteintes par cette maladie en 2020. Il n'y a pour le moment aucun traitement efficace pour cette maladie. L'accumulation de peptides  $\beta$ -amyloïdes (A $\beta$ ), formant à terme les plaques amyloïdes, est l'élément déclencheur de la neuro-dégénérescence. Une importante production de la protéine TIMP-1 a été mise en évidence par les astrocytes environnants les plaques amyloïdes.

Ce projet fait suite à des travaux préalables ayant mis en évidence que la protéine TIMP-1 module la différenciation et la plasticité neuronale, ce qui suggère une implication de cette protéine dans la neurodégénérescence. Les manipulations réalisées dans le cadre de ce projet ont pour but de prélever les neurones corticaux d'embryons de souris âgées de 18 jours afin de pouvoir tester les effets de la protéine TIMP-1 et de différents mutants afin de déterminer le mode d'action de cette protéine sur les neurones. Un nombre

maximal de 25 souris gestantes et leurs embryons âgées de 18 jours seront sacrifiées sur l'ensemble du projet pour réaliser les analyses nécessaires.

L'élevage des animaux et l'ensemble des expérimentations seront réalisés dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Le projet s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en optimisant les conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux et en tenant compte de la sensibilité des animaux ainsi que des contraintes liées à l'espèce. Ce projet tient compte des points limites et de la prévention de la douleur afin d'assurer l'absence de douleur et de favoriser le bien-être des animaux tout au long de leur vie.

5317. Depuis plus de 30 ans, la population d'anguille Européenne (*Anguilla anguilla*) enregistre une baisse constante et importante des arrivées de civelles. En juin 2007, l'espèce a été classée à l'annexe II de la CITES (convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction) et le 17 septembre 2007, le règlement européen 1100/2007, dont les objectifs sont la reconstitution, la protection et l'utilisation durable des stocks d'anguille, a été édité au Journal Officiel. Au niveau des côtes européennes, les civelles d'anguille remontent les estuaires pour rejoindre les zones de croissance en eau douce, mais de récentes études démontrent que certains individus ne rejoignent jamais les rivières et s'installent en estuaire, voire en mer. Le déterminisme des différents patrons de migration n'est toujours pas élucidé et l'enjeu est de taille, puisqu'il est généralement admis dans la littérature que les anguilles migrantes en amont tendent à donner des femelles alors que la proportion de mâles est plus importante en aval.

La plupart des civelles vont jeûner lors de la migration et la capacité des individus à adapter leur métabolisme et à mobiliser leurs réserves énergétiques durant la migration pourraient jouer un rôle clé dans leur propension à migrer. L'autophagie est un mécanisme permettant aux cellules de mobiliser leurs réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines) au cours de stress cellulaires (carence nutritionnelle, stress énergétique...) afin d'assurer un approvisionnement en nutriments et énergie. La migration des civelles est rythmique et synchronisée par la photopériode et les courants de marée. L'hypothèse posée dans cette étude est que la capacité à mettre en place les mécanismes d'autophagie pourrait varier entre les individus et ainsi affecter leur potentiel de migration. Par ailleurs, la migration estuarienne se déroule dans un écosystème soumis à une forte pression anthropique (contaminants), pouvant affecter les capacités autophagiques et de migration des civelles d'anguilles. Dans ce projet de 4 ans, nous avons pour objectif de mettre en relation le potentiel migratoire des civelles d'anguille avec leurs capacités autophagique et métabolique, de déterminer l'impact de différents contaminants sur cette relation, et de mettre en relation le comportement migratoire des civelles et la réponse au stress environnemental avec le polymorphisme de certains gènes impliqués dans l'autophagie.

De par la particularité du cycle de vie et de la migration estuarienne de l'anguille européenne, l'utilisation pour cette étude d'une autre espèce de poisson est impossible (Remplacement). Environ 2000 individus seront utilisés, représentant environ 600g de poisson (raffinement). Pour réaliser cet objectif, nous utiliserons des techniques de marquage individuel ainsi que des méthodes de mesures (micro-respirométrie, analyseur élémentaires) et d'analyses (mise au point de l'analyse d'expression de gènes sur de petits échantillons) très sensibles. Les pêches seront effectuées au tamis à main par nos soins, technique moins traumatisante que le tamis poussé utilisé par la pêche professionnelle. Par ailleurs, notre expertise en biologie et comportement de la civelle d'anguille, nos installations expérimentales (permettant de mimer les conditions naturelles de température, de photopériode et d'alternance de courant de marée), des observations quotidiennes des animaux ainsi que des mesures de température et d'oxygène de l'eau contribueront à mettre en place des conditions expérimentales optimales pour les animaux (raffinement).

5318. Le cancer constitue un problème de santé publique majeur. La compréhension des mécanismes mis en jeu dans la progression tumorale et la mise au point de nouvelles stratégies tumorales font partie des grands enjeux scientifiques actuels. Parmi les mécanismes mis en jeu, l'angiogenèse joue un rôle majeur dans la croissance tumorale, la dissémination métastatique et la réponse aux traitements.

Par ailleurs, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas encore possible dans le domaine de l'oncologie. En effet, le développement d'une tumeur et de sa vascularisation sont des mécanismes complexes impliquant l'interaction entre de nombreux types cellulaires (cellules tumorales, endothéliales, stromales) et nombreux composants matriciels (collagène, fibronectine, protéoglycanes, etc), qui, pour être modélisés sur de réelles bases physiologiques et structurales, nous obligent de réaliser ces études chez l'animal. La réalisation de ce protocole nécessitera au maximum 190 souris. Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés (Réduction). En conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, imagerie), et euthanasiées dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

De plus, nous utiliserons des techniques d'imagerie non invasive permettant de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement) et le nombre d'animaux en réalisant des images de la tumeur et de la vascularisation tumorale dans le temps sur un même animal (Réduction).

La réalisation de ce projet d'expérimentation animale permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'élaboration de l'angiogenèse tumorale et d'évaluer le rôle anti-tumoral de certains composés pharmacologiques.

5319. En France, le mélanome cutané se situe au 11ème rang des cancers les plus fréquents, tous sexes confondus, et cause le décès de 75% à 80% des personnes atteintes. En effet, son diagnostic précoce permet un traitement efficace, mais s'il devient métastatique et résistant aux traitements conventionnels (chirurgie et chimiothérapie), la survie globale du patient peut être très brève (8 à 18 mois). Cependant, ces traitements lourds aboutissent fréquemment à de la cytotoxicité et à la manifestation d'effets secondaires. C'est pourquoi il existe une demande croissante pour le développement de thérapies alternatives anti-mélanome, comme l'utilisation de médicaments homéopathiques, générant moins d'effets secondaires. Afin de tester un éventuel effet des traitements homéopathiques, un modèle murin de cellules de mélanome injectées chez la souris constitue un excellent modèle pour étudier la biologie de la tumeur en présence de ces médicaments.

Un projet de recherche in-vivo réalisé antérieurement a permis de montrer les effets de deux médicaments homéopathiques administrés chaque jour dans l'abdomen de la souris, dès l'injection sous la peau de cellules de mélanome (en utilisant des souris de même origine génétique). Un ralentissement significatif du développement tumoral de l'ordre de 20 à 30% a été observé, ainsi qu'une diminution de la vascularisation tumorale suivie d'une augmentation de la mort prématurée des cellules cancéreuses sans effets secondaires. Enfin, une augmentation significative du temps de survie a également été constatée.

Dans la continuité de ces travaux, il paraît essentiel de poursuivre la recherche en ce sens afin de déterminer les conditions pour lesquelles les traitements sont les plus efficaces contre le développement tumoral. D'autres études effectuées dans différents laboratoires par notre partenaire industriel dans d'autres modèles tumoraux ont montré l'efficacité d'un traitement préventif. Il apparaît donc nécessaire de conforter les précédents résultats en traitant en amont les animaux sur une période de 14 jours, puis pendant la période de croissance tumorale. Enfin, l'étude de l'efficacité d'un traitement curatif sur le développement tumoral permettrait de compléter ce projet. Dans ce cas, l'injection des médicaments sera administrée aux animaux dès apparition palpable de celle-ci. Ces protocoles (420 animaux, principe de réduction) seront appliqués dans un premier temps sur un modèle de cellules de mélanome murin (B16F1) en sous-cutané chez la souris, puis dans le lobe de l'oreille de souris (B16F10) ce qui présente l'avantage de pouvoir étudier la tumeur primaire et les métastases spontanées qui lui sont associées. Dans chacun des deux cas d'étude, le volume et/ou la vascularisation de la tumeur sera suivi par des méthodes non invasives d'imagerie (scanner à rayon X). De plus, afin de réduire la souffrance et l'angoisse des animaux les souris seront anesthésiées par isoflurane (4%). Enfin, afin de limiter le stress et l'ennui des animaux, les cages seront enrichies en équipements divers.

5320. Ce projet vise à mettre au point d'un dispositif de test de comportement animal destiné à mesurer la mémoire topographique des souris dans un environnement complexe. L'appareil, permet de nombreuses prises automatisées d'informations (déplacement, prise de nourriture, prise hydrique, activité physique,...) et repose sur l'habituation de l'animal à un environnement complexe et enrichi. Il devrait intéresser de nombreux domaines de recherches (neurosciences, prise alimentaire, sciences du mouvement,...). Aucune méthode alternative ne permet d'atteindre l'objectif scientifique fixé. La mise au point des procédures se fera sur des lots de souris de différentes souches, males et/ou femelles, et des animaux modèles de vieillissement ou de maladies neurodégénératives (Alzheimer). En tenant compte du nombre minimum de souris nécessaires par groupe pour valider statistiquement les résultats, un total de 288 souris sera utilisé dans cette étude. Aucune angoisse ou souffrance particulière n'est a priori attendue, l'exploration du Hamlet constituant un environnement enrichi.

5321. Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé (définition de l'organisation mondiale de la santé). En 2014, plus de 1,9 milliard d'adultes étaient en surpoids. Sur ce total, plus de 600 millions étaient obèses. L'obésité est un facteur de risque pour de nombreuses pathologies, dont les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Face à ce problème majeur de santé publique, plusieurs approches sont utilisées, dont l'utilisation de compléments alimentaires permettant de limiter la prise de poids et/ou les désordres métaboliques associés à l'obésité (dont l'insulino-résistance).

Dans ce projet nous chercherons à mettre en évidence l'effet d'extraits végétaux de composition confidentielle sur l'obésité et les désordres physiopathologiques qui lui sont associés (notamment l'insulinorésistance), dans le but ultime de développer un complément alimentaire chez l'homme. Cet extrait végétal a été choisi suite à un précédent projet et vise à affiner la dose efficace de cet extrait, seul et en combinaison avec un autre composé.

Nous étudierons l'effet biologique de l'extrait en utilisant deux approches complémentaires :

1) lors du développement de l'obésité induit par l'alimentation (effet préventif) : dans ce cas les souris seront nourries pendant 10 semaines avec un régime riche en lipides (HF45, 45% de l'énergie apportée) supplémenté ou non avec un ou deux extraits (5 conditions testées). Un groupe recevant un régime à teneur normale en lipides (régime d'entretien AIN-93M, 10% de l'énergie apportée) pendant toute la durée de l'étude (12 semaines) servira de groupe contrôle normopondéral.

2) les deux combinaisons les plus favorables identifiées en 1) seront testées dans un modèle génétique de pré-diabète de type 2 (souris db/db) mais cette fois dans le cadre d'un régime à teneur lipidique normale (AIN-93M)

Le nombre total d'animaux nécessaires sera de 120.

Afin de mettre en évidence le développement de l'obésité et de ses conséquences métaboliques, une combinaison de mesures est prévue :

- pesée hebdomadaire et mesure de la consommation alimentaire ;
- prélèvements sanguins afin de mesurer l'évolution de la glycémie et de l'insuline plasmatique ;
- passages en cage calorimétrique pendant 24 heures afin de mesurer différents paramètres permettant d'affiner la caractérisation du phénotype obèse (consommation d'oxygène et expiration de dioxyde de carbone, prise alimentaire et hydrique) ;

- collection de fèces en début puis au cours du protocole pour caractériser le microbiote et mettre en évidence d'éventuelles modifications en fonction du régime ;
- mesure de la réponse glycémique en réponse à l'insuline pour mettre en évidence un dysfonctionnement de la réponse à l'insuline.

A l'issue des études, les animaux seront sacrifiés sous anesthésie générale pour prélèvement d'organes afin de caractériser les effets biologiques dans différents tissus.

Cette étude prend en compte la règle des 3 Rs :

**Remplacement** : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact de compléments alimentaires sur l'insulino-résistance et la prévention de l'obésité. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observés chez l'homme.

**Réduction** : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes. Nous combinerons des études réalisées des études appliquées concernant la mise au point de compléments alimentaires en collaboration avec une société industrielle avec une étude de recherche fondamentale (effet de la vitamine D). Ceci permettra de réduire le nombre d'animaux en utilisant les mêmes groupes contrôle pour l'étude de l'effet de la vitamine D et celui des extraits à l'aide du modèle db/db.

**Raffinement** : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives et l'utilisation de cages calorimétriques permet de recueillir un grand nombre de données (enregistrement sur 24 heures) en utilisant un faible nombre d'individus (8 souris/groupe). Les animaux seront hébergés en cage de 2 à 4 individus, et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal.

5322. Cette formation est destinée à former des médecins pratiquant la radiologie interventionnelle à l'utilisation (implantation intravasculaire) de matériaux complexes (coils, plugs, agents liquides) afin de leur donner les connaissances nécessaires et les gestes techniques pour pouvoir pratiquer ces techniques innovantes en pratique clinique courantes chez les patients. En effet, les agents implantables font l'objet d'un fort développement et de recherches poussées, ce qui amène très régulièrement des innovations dans ce domaine. Bon nombre de ces innovations présentent des complexités techniques spécifiques nécessitant un apprentissage spécifique.

Nous proposons donc d'organiser des sessions pédagogiques d'utilisation des agents innovants sur le Porc. Ce modèle a été choisi car il est très proche de l'Homme du point de vue anatomique, ce qui est une obligation pour réaliser l'implantation de matériaux destinés à l'Homme. Le modèle porcin présente également l'avantage de pouvoir utiliser du matériel identique à celui dédié à l'Homme. Par ailleurs, avec un seul animal, il est possible de réaliser de très nombreuses procédures car tous les organes du porc peuvent être mis à contribution. Au cours d'une séance avec un seul animal, il est donc possible de former un nombre de médecins conséquent (jusqu'à 8 par session). Chaque médecin exécute à tour de rôle, des gestes techniques sous la supervision du radiologue enseignant ce qui lui permet de se familiariser avec la technique. Les autres participants profitent en temps réel de chaque acte réalisé grâce à la retransmission directe des images scopiques sur le moniteur implanté dans la salle. Il sera organisé jusqu'à 15 sessions par an, impliquant l'utilisation maximale de 15 animaux par an, soit un total de 75 animaux pour les 5 ans du projet. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée, de l'eau de boisson à volonté et seront stabulés en groupe pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire le stress dans un box de 9m<sup>2</sup> (individus de poids <50kg) avec enrichissement (cordes pendantes, chaînes, jouets et balles anti-morsure).

Cette formation doit permettre aux médecins pratiquant la radiologie interventionnelle d'utiliser avec efficacité et sécurité des agents d'embolisation innovants en pratique clinique courante.

5323. Les staphylocoques, sont des bactéries largement répandues dans l'environnement ainsi qu'au niveau des organismes vivants. Chez l'homme et l'animal sains, ils vivent à la surface de la peau et des muqueuses et font partie de la flore appelée commensale. Dans certains cas de baisse des défenses de l'organisme ou de rupture des barrières de protection naturelles, ils peuvent causer des infections locales superficielles ou profondes (abcès) voire diffuser et infecter d'autres organes. Un type particulier, le *Staphylococcus aureus*, communément désigné staphylocoque doré, est plutôt considéré comme agent pathogène mais certains sujets sains en sont porteurs sans développer d'infections, on parle alors de colonisation.

Le portage nasal à *Staphylococcus aureus* concerne 20-30% de la population générale non malade et constitue un facteur de risque d'infections en particulier chez les patients opérés de chirurgie cardio-vasculaire et orthopédique surtout car il peut passer de la surface des muqueuses à des tissus profonds à l'occasion de la chirurgie. Pour éviter cela, la décontamination nasale (DN) a démontré un effet bénéfique. Il s'agit d'appliquer dans les narines un ou des agents antibiotiques.

En tant qu'antibiotique, la mupirocine est la molécule de choix pour la DN mais des germes résistants commencent à émerger justifiant le besoin de nouvelles molécules.

Le but de ce projet est de tester chez la souris la tolérance et l'efficacité d'une molécule (M) en cours de développement au sein de notre institution en comparaison avec 2 antibiotiques largement utilisés en clinique : la Vancomycine et la mupirocine.

- Dans un premier temps nous testerons la tolérance de cette molécule appliquée sur la peau des souris sous forme de gel ou de pommade vaselinée.

- Dans un second temps nous testerons son efficacité à réduire le nombre de bactéries sur la peau dans un modèle de colonisation cutanée par *Staphylococcus aureus*. Pour ce faire, nous utiliserons des souris Balb/c femelles. La colonisation sera effectuée par simple dépôt d'une solution infectante contenant *Staphylococcus aureus* sur une zone rasée du dos de l'animal. L'application de la

préparation antibiotique sera effectuée 1 h après le rasage par simple dépôt. Le rasage sera effectué après une sédation sous anesthésie volatile légère.

Ce protocole tient compte des recommandations de raffinement car basé sur des publications antérieures ayant montré l'innocuité de ce type d'infection qui ne provoque pas d'abcès, pas de rougeur, pas d'inconfort et aucun décès des animaux. Le simple dépôt des bactéries et des antibiotiques à la surface permet d'éviter les injections. Les prélèvements par écouvillonnage de surface sont des procédures non invasives. Il n'est pas attendu de douleur après cette procédure ni dans les heures ou jours qui suivront.

Pour réduire le nombre d'animaux, nous n'utiliserons pas de groupe contrôle mais effectuerons une application de l'antibiotique et du placebo sur le même animal grâce à une partition de la peau en deux zones à tester séparées visuellement par un trait de feutre stérile (utilisé pour le repérage chirurgical chez l'humain). Chaque animal sera ainsi son propre témoin. Une réduction et un raffinement seront permis grâce à des prélèvements successifs par écouvillonnage de surface sur le même animal au cours du temps. Des études préliminaires *in vitro* visant à déterminer la dose minimale efficace permettront de cibler d'emblée la concentration d'antibiotique adéquate à tester permettant de remplacer les tests de concentration *in vivo*.

L'effectif de chaque groupe sera entre 3 et 5 animaux portant à 80 au maximum le nombre d'animaux y compris les quelques animaux utilisés pour la mise au point.

5324. La maladie d'Alzheimer est un enjeu important des prochaines décennies, du fait du vieillissement global de la population et de l'absence de traitements efficaces.

Les lésions du cerveau des patients comprennent l'accumulation de deux protéines toxiques qui entraîne la mort des neurones. Il a été mis en évidence le rôle de PKR dans ces accumulations, ainsi que dans l'apparition de la maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les conséquences d'une inhibition (par KO génétique) de PKR chez un modèle de souris reproduisant la maladie d'Alzheimer. Le résultat attendu est l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique de cette maladie.

Afin d'utiliser le moins de souris possible, nous nous limiterons à un nombre de 6 souris par groupe (Wild Type, 5xFAD, PKR KO et 5xFADxPKRKO) pour les analyses comportementales à 5 mois et 8 mois. Ces souris seront ensuite sacrifiées à 8 et 11 mois respectivement pour compléter les analyses en biologie moléculaire. Les différents âges de sacrifice sont nécessaires afin d'étudier la mort neuronale à son commencement, son pic puis son plateau. Ces chiffres sont dans la fourchette basse du nombre d'animaux nécessaire pour publier et nous permettre de réaliser des statistiques adéquates. Nous utiliserons donc au total 120 souris.

Les souris transgéniques Alzheimer (5xFAD) ne souffrent pas physiquement de la pathologie. Elles expriment les premiers symptômes vers 3 mois et un déclin cognitif à partir de 4-5 mois.

Les souris PKR KO ne souffrent d'aucune pathologie à notre connaissance. Lorsqu'elles seront croisées aux souris 5xFAD, nous nous attendons à obtenir un modèle qui rétablit le phénotype Alzheimer. Aucune de ces souris ne subira de traitement ou d'injection, le modèle d'inhibition de la PKR étant un modèle transgénique PKR KO.

Les critères de bien-être sont définis avec précision (perte de poids, dyspnée, prostration...) afin d'éviter toute douleur chez l'animal.

Après la mise à mort des animaux, le sang et les tissus (cerveau et potentiellement pancréas) seront prélevés, stockés et dédiés aux analyses moléculaires, biochimiques et histologiques.

La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de façon fiable, ces interactions présentes au sein d'un tissu tel que le cerveau et des échanges entre cellules, tissus et organes.

Ce projet sera réalisé au sein de quatre laboratoires, dont une plateforme de comportement pour analyser leur mémoire et un laboratoire de recherche fondamentale afin d'analyser les échantillons biologiques. Les deux autres laboratoires, ne réalisent pas d'expérimentations animales pour ce projet.

5325. Le myélome multiple est la deuxième hémopathie maligne la plus répandue dans le monde. Cette maladie est à l'origine d'une destruction osseuse et de dysfonctionnements des organes vitaux. Cette maladie représente donc un problème de santé majeur. Malgré le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, le myélome multiple reste incurable dans la plupart des cas. L'objectif est donc de trouver de nouveaux traitements qui vont augmenter l'efficacité des traitements actuels et ainsi induire la guérison des patients à long terme. Une nouvelle voie thérapeutique est apparue au cours des cinq dernières années : l'immunothérapie. Cette approche consiste à stimuler le système immunitaire autologue du patient afin de lutter contre les cellules tumorales. Basée sur l'administration d'anticorps monoclonaux, ces traitements ciblent principalement des molécules exprimées à la surface de lymphocytes tueurs. Devant les résultats spectaculaires obtenus dans le mélanome et le cancer du poumon, ces approches doivent être testées dans le myélome. Pour ce faire, comprendre et suivre le comportement des cellules immunitaires *in vivo* dans un modèle murin de myélome est donc essentiel afin de créer des stratégies thérapeutiques appropriées et innovantes. L'utilisation de l'animal est indispensable car il n'existe pas de modèle *in vitro* qui puisse remplacer parfaitement la tumeur au sein de son microenvironnement ainsi que son évolution dans un organisme vivant. De plus, l'utilisation de l'animal est une étape essentielle avant de passer aux tests cliniques sur l'homme.

Ce projet s'intéresse dans un premier temps au suivi de la maladie chez différentes souches de souris immunocompétentes ou immuno-déprimées injectées avec des cellules cancéreuses d'origine murine ou humaine. Ces souris seront traitées avec différents anticorps monoclonaux qui vont cibler et activer les lymphocytes anti-cancéreux. Ces agents seront injectés seuls ou en association avec des agents chimio thérapeutiques classiques du myélome afin de déterminer le potentiel curatif de l'immunothérapie dans le myélome. Le suivi de la maladie se fera par l'analyse du taux d'anticorps circulant par le biais de prélèvements sanguins bimensuels. Cette méthode permet de limiter le stress et la souffrance encourue par l'animal vivant dans un environnement enrichi

(bâtonnets de coton, granulés à disposition dans les cages), tout en générant de nombreuses informations sur l'efficacité des traitements. De plus, le suivi longitudinal obtenu grâce à cette méthode entraîne une réduction du nombre d'animaux par procédure, puisqu'il permet de ne pas sacrifier les animaux à chaque mesure. L'objectif de ce projet, nécessitant l'utilisation de 3900 animaux sur une période de 5 ans est de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques contre le myélome et d'évaluer leur efficacité préclinique.

Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement) :

1- Remplacement : le recours à l'expérimentation animale dans le cadre de cette étude se fait après de nombreuses études in vitro dans des modèles cellulaires montrant l'importance de ces facteurs dans la physiopathologie. Les études in vitro ne reproduisent pas l'ensemble des voies impliquées dans des modèles physiologiques intégrés et par conséquent ne permettent pas l'obtention de résultats scientifiques exploitables et pertinents de la pathologie humaine.

2- Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Des études préliminaires nous ont permis de maîtriser ces modèles murins permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux. De plus, nous avons déjà validé certaines de nos approches expérimentales in vitro permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 5 à 10 souris permettent d'acquérir des données fiables. Les rongeurs utilisés sont consanguins et de mêmes âges réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables.

3- Raffinement : Le bien-être de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'enrichissement de leur environnement (coton afin qu'ils puissent faire un nid) et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). De plus une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée avant l'expérimentation et des mesures antalgiques seront mises en œuvre.

5326. La formation du tissu osseux par les ostéoblastes, les cellules ostéoformatrices, est contrôlée par de nombreux facteurs tels que les hormones sexuelles. Il a été montré que d'autres molécules appelées microRNAs, régulent également l'activité des ostéoblastes.

Nous avons identifié au laboratoire un microARNs (miR-199) comme un régulateur positif de la formation osseuse. Lorsque l'expression de ce microARN est augmentée dans les ostéoblastes, la capacité de ces cellules à synthétiser une nouvelle matrice osseuse est augmentée en culture. En augmentant la synthèse de ce microARN dans l'ostéoblaste chez la souris (souris transgéniques), nous avons également obtenu une augmentation importante de la masse osseuse sans altérer les propriétés mécaniques de l'os ainsi qu'un maintien de la masse osseuse chez la souris âgée aussi bien chez les mâles que chez les femelles. Ces souris n'ont aucune modification dommageable par ailleurs. Un autre laboratoire a montré en 2008 qu'à l'inverse l'absence de ce microARNs dans tous les organes chez la souris réduit la formation osseuse et le développement du squelette.

Ces souris transgéniques uniques nous ont permis de montrer que ce microARN est capable de prévenir la perte osseuse liée à l'âge, nous voudrions déterminer à présent s'il est capable de prévenir la perte osseuse liée à la ménopause. Les différents paramètres du tissu osseux (densité, microstructure) seront évalués après ovariectomie chez des souris femelles adultes (modèle de ménopause chez la souris) en utilisant des approches classiques. L'étude du tissu osseux nécessite l'euthanasie de l'animal car le prélèvement in vivo chez la souris serait dommageable pour l'animal et douloureux. Nous utiliserons 110 souris maximum pour l'ensemble de cette étude qui s'étendra sur 5 ans.

Afin de diminuer le nombre d'animaux et respecter la règle des 3R, le nombre d'animaux/génotypes/groupes expérimentaux qui correspond au nombre minimal nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante sera de 10. Par ailleurs, le nombre de souris dans les groupes contrôle sera réduit au minimum (5 animaux par groupe et par génotype).

Pour veiller au bien-être des animaux, une analgésie se fera en pré- et post-opératoire suivie d'une observation régulière de l'animal jusqu'à la fin de l'étude (4 à 8 semaines post-chirurgie). Un certain nombre de points critiques seront surveillés permettant d'évaluer la présence éventuelle de souffrance ou douleur. Au cas où des douleurs ou souffrances persisteraient en dépit des traitements entrepris, la décision d'euthanasie sera prise.

Notre projet s'inscrit dans le cadre de l'application des microARNs dans le domaine de la thérapie. Le miR-199 pourrait avoir une application thérapeutique potentielle dans le cadre des pertes osseuses associées aux pathologies telles que l'ostéoporose.

5327. Notre laboratoire dispose depuis près de 15 ans d'un agrément ministériel réglementaire pour le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale (agrément renouvelé régulièrement) pour une durée de cinq ans. Pour cette activité qui est supervisée par les médecins biologistes, nous recevons des liquides amniotiques prélevés par amniocentèse sur lesquels nous réalisons en parallèle une recherche d'ADN toxoplasmique par PCR en temps réel et une recherche du parasite par inoculation d'une partie du prélèvement à la souris. Pour chaque prélèvement, dix à douze souris (en fonction du volume de liquide amniotique reçu au laboratoire) sont inoculées par voie intra-péritonéale. Le marquage des animaux et les inoculations sont réalisés dans le service commun de l'animalerie hospitalo-universitaire, où les animaux sont maintenus après inoculation, et prélevés 3 semaines et six semaines après pour recherche d'une séroconversion. En cas de positivité sérologique, un lavage péritonéal est réalisé après euthanasie de l'animal, ainsi qu'un prélèvement biopsique de cerveau, pour recherche d'ADN toxoplasmique. Ces techniques sont utilisées par tous les laboratoires impliqués dans le diagnostic prénatal de la toxoplasmose congénitale.

Au cas où une hypothétique souffrance serait diagnostiquée chez un des animaux de cette procédure, une euthanasie serait alors pratiquée.

Le savoir-faire et la formation des techniciens animaliers qui réalisent ces gestes ainsi qu'une surveillance quotidienne des animaux participent au respect de la règle des 3 R. Le laboratoire reçoit chaque année une vingtaine de liquides amniotiques; 300 animaux par an au maximum seront utilisés soit 1500 animaux pour les 5 prochaines années.

5328. Depuis la découverte de la souris immunodéprimée athymique (souris nude), il est possible de greffer des cellules tumorales ou des fragments de tumeurs humaines sur cette souris incapable de produire des lymphocytes T et donc d'initier un rejet de greffe. Ce modèle est très utilisé en oncologie, pour sélectionner de nouvelles molécules anti-cancéreuses. La sélection de nouveaux médicaments repose en effet sur leur efficacité antitumorale dans des expériences réalisées dans des modèles de souris immunodéprimées porteuses de tumeur d'origine humaine. On parle alors de xénogreffe tumorale. Ces modèles reposent préférentiellement sur l'injection de lignées cellulaires cancéreuses d'origine humaine car elles sont faciles à amplifier et à conserver sous forme congelée. Ces lignées sont également bien caractérisées, et relativement stables au cours du temps. Toutefois, l'efficacité antitumorale des molécules sur de telles xénogreffes et sur les tumeurs des patients est souvent faiblement corrélée. Les lignées cellulaires tumorales présentent en effet par rapport aux tumeurs des patients plusieurs désavantages permettant d'expliquer cette faible corrélation. Premièrement, il existe un biais de sélection lors de l'établissement de ces lignées et de leur propagation induit par les réactifs et les méthodes de culture cellulaire utilisés. La lignée cellulaire obtenue ne représente donc pas l'hétérogénéité que l'on peut retrouver dans la tumeur du patient. De plus, une fois injectées chez la souris, les lignées cellulaires ne présentent pas de signalisation avec le microenvironnement. Ce microenvironnement est notamment à l'origine de la vascularisation tumorale et permet l'installation d'un infiltrat immunitaire et d'un tissu conjonctif favorable au développement tumoral. Cette signalisation a souvent une fonction importante dans le développement de la tumeur chez les patients. Afin de palier à ces inconvénients, un modèle amélioré de xénogreffe est de plus en plus utilisé : il s'agit de xénogreffe dérivée de la tumeur du patient, couramment appelé PDX (« patient-derived xenograft »). Ce modèle résulte de l'implantation directe d'un fragment tumoral du patient fraîchement prélevé, chez des souris immunodéprimées. Lors de transplantations successives, la PDX va alors se stabiliser et conserver, dans la plupart des cas, les caractéristiques de la tumeur humaine initiale. Au vu de leurs avantages par rapport aux modèles reposant sur l'utilisation de lignées cellulaires, les PDX ont vu leur développement s'accélérer depuis quelques années.

Nos travaux de recherche ont pour objectif d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de neuroblastome. Le neuroblastome est le cancer solide le plus fréquent chez l'enfant. Le pronostic des neuroblastomes de haut grade demeure encore très péjoratif avec un taux de survie à 5 ans d'environ 25 %. Il reste urgent de développer des thérapeutiques innovantes afin d'améliorer la prise en charge de ces patients. Dans ce but, nous souhaitons développer une banque de 10 modèles PDX de neuroblastome qui nous permettra à terme d'évaluer de façon pertinente les différentes stratégies thérapeutiques développées au laboratoire.

Ces études nécessitent impérativement un tissu tumoral en place dans un système physiologique pharmacodynamique et comprenant un réseau vasculaire capable de se remodeler à partir de toute cellule de l'organisme, c'est-à-dire un modèle animal. Il n'existe aucune autre procédure in vitro qui puisse remplacer ces expériences. Afin d'établir le modèle PDX, deux souches de souris immunodéprimées (Nude et NSG) seront utilisées lors la première transplantation et deux types de greffe seront réalisés (greffe sous-cutanée et greffe au niveau de la glande surrénale). Dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux, seule la souche et la voie d'implantation présentant le meilleur taux de prise tumorale seront retenues. Le nombre total estimé pour ce projet est de 460 souris. Pour leur confort, les animaux seront hébergés en groupe (5 max) avec enrichissement et seront surveillés quotidiennement avec mise en œuvre de mesures antalgiques appropriées.

5329. Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur cérébrale la plus fréquente et la plus agressive (grade IV). En dépit des traitements actuels (exérèse chirurgicale de la tumeur, suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie), le GBM développe rapidement une résistance aux traitements à l'origine de rechutes. Le taux de survie des patients est très faible (seulement 3 à 5% survivent au-delà de 2 ans). Par conséquent, le développement d'une nouvelle thérapie pour le GBM est nécessaire. Ainsi, une nouvelle molécule de ferrocifène, le FcTriOH, a montré une puissante cytotoxicité in vitro sur la lignée cellulaire U87MG (cellule GBM humaine). Par ailleurs, nos récentes expériences ont permis de développer et de caractériser des nanoparticules encapsulant ces ferrocifènes (FcTriOH). Ainsi, nous avons pu montrer une potentialisation du ciblage tumoral suite au greffage d'un peptide pénétrant à la surface des nanovecteurs utilisés pour améliorer la distribution de LNC-FcTriOH. C'est pourquoi, l'objectif de ce projet est d'évaluer sur un modèle in vivo l'efficacité thérapeutique du FcTriOH encapsulé dans des vecteurs innovants sur des modèles murins de GBM.

Ce projet sera réalisé sur 96 rongeurs (souris) sur une période de deux années d'expérimentation.

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés.

- Le traitement d'organismes intégrés par de faibles doses de toxiques a un caractère de stricte nécessité afin d'évaluer les effets au niveau des différents tissus et organes et ne peut pas être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information;
- Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet.
- Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

5330. Les lipopolysaccharides (LPS) (ou endotoxines) sont des composants de la membrane externe des bactéries Gram (-). Leur présence dans la circulation sanguine conduit à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires stimulant la réponse immunitaire permettant la destruction et l'élimination des bactéries pathogènes. Cependant, une réponse inflammatoire excessive peut conduire au choc septique, caractérisé par de sérieuses anomalies circulatoires pouvant induire de graves défaillances multi organes et

provoquer la mort des patients (30 à 50% des cas). L'incidence mondiale de ce syndrome est estimée à 18 millions de cas par an et aucun traitement réellement efficace du choc septique n'a été identifié à ce jour.

La protéine plasmatique de transfert des phospholipides (PLTP) appartient à une famille de protéines impliquées dans la défense antimicrobienne et l'immunité innée. Ces protéines sont en effet capables de lier différents composés de nature lipidique dont les LPS. Des expériences *in vitro* ont montré que la PLTP pouvait transférer les LPS des parois des bactéries Gram(-) vers les lipoprotéines et neutraliser ainsi leurs effets biologiques. Ce rôle de la PLTP dans la neutralisation des effets induits par les LPS a été indirectement confirmé *in vivo*, chez des souris déficientes en PLTP. Il a été notamment observé que l'absence de PLTP retarde l'association des LPS avec les lipoprotéines circulantes, augmente la production de cytokines inflammatoires, diminue l'élimination des LPS et réduit la durée de survie des animaux. Dans ce contexte, il est apparu que la production de PLTP recombinante pourrait constituer un outil thérapeutique dans la prévention et le traitement de l'endotoxémie et du sepsis.

L'objectif de notre projet de recherche est donc de produire de la PLTP recombinante humaine afin de disposer après purification de quantités suffisantes de cette protéine pour évaluer son potentiel thérapeutique dans des études précliniques de traitement du choc septique. Pour cela nous avons choisi un modèle de lapins transgéniques qui expriment la PLTP humaine sous le contrôle du promoteur du petit lait ce qui permet une expression spécifique de la protéine dans les cellules de la glande mammaire.

Notre projet répond à la règle des 3 R

**Remplacement** : Initialement la PLTP a été purifiée à partir du plasma humain. Cependant le plasma humain est relativement pauvre en PLTP. Plusieurs tentatives pour produire de la PLTP recombinante de différentes espèces de mammifères dans divers types de cellules eucaryotes transfectées ont été effectuées mais ne permettent pas de la produire sous forme active et en quantité suffisante pour tester son activité *in vivo* d'où la nécessité d'avoir recours au modèle animal.

**Raffinement** : La production de protéines dans le lait de lapins offre de nombreux avantages : génération aisée des lapins transgéniques, fertilité élevée, maturation des protéines similaires à celles se produisant chez l'homme. Le lait de lapin se récolte facilement, en quantité importante, et sans souffrance pour l'animal.

**Réduction** : Le lait de lapin étant extrêmement riche en protéines, peu de lapins sont donc nécessaires pour produire de grandes quantités de protéine.

Ces études nécessiteront au total l'utilisation de 40 lapins sur 5 ans.

5331. *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène particulièrement fréquente dans les infections acquises en ville et à l'hôpital. Il est associé à une résistance élevée aux antibiotiques, et est également doté d'un grand nombre de facteurs de virulence et de toxines. Parmi elles, la toxine de Pantone et Valentine (PVL) est produite par moins de 5% des souches circulant en France mais est plus fréquemment retrouvée aux USA. Elle est associée à des tableaux cliniques divers, tels que des infections cutanées, ostéo-articulaires, et respiratoires basses (pneumonies nécrosantes), en particulier chez l'enfant et le jeune adulte sans facteur de risque. Ces infections sont associées à une mortalité extrêmement rapide.

Les recommandations actuelles préconisent l'utilisation de la vancomycine, du linézolide ou de la clindamycine pour le traitement de la pneumonie à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). Cependant, on observe chez certains isolats de SARM une résistance à la clindamycine et la vancomycine. Le développement de nouveaux antibiotiques est donc une nécessité. Le ceftobiprole présente une activité *in vitro* bien documentée sur les souches de SARM, y compris celles qui présentent une sensibilité réduite à la daptomycine, au linézolide et à la vancomycine.

Le lapin est le modèle de choix pour étudier le rôle de la PVL dans la pneumonie nécrosante car la PVL produit des effets similaires chez les globules blancs de l'homme et ceux du lapin. En outre, les lapins sont plus sensibles aux effets cytotoxiques de la PVL que la souris.

Dans le cadre de cette étude, d'une durée de 12 mois, une attention particulière sera apportée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste sera de 12 par groupe. Ce nombre a été déterminé grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Plusieurs éléments ont été mis en place pour répondre au concept du raffinement : Le patron du gilet utilisé pour le maintien du cathéter et permettant la libre circulation de l'animal dans sa cage a été amélioré pour en accroître son confort. Les conditions d'hébergement ont également été optimisées par l'enrichissement du milieu. Enfin, l'utilisation d'analgésique a été mise en place pour réduire la douleur post-opératoire. Dans le contexte de l'étude, le remplacement du modèle *in vivo* pour la constitution d'une pneumonie expérimentale par un autre système n'est pas envisageable notamment pour des aspects de diffusion tissulaire et systémique.

Dans cette étude, deux souches seront testées, une produisant la toxine PVL et un clone ne la produisant pas. Quatre traitements par souche seront évalués (clindamycine, linézolide, vancomycine et ceftobiprole) auxquels s'ajouteront des lapins témoins sans antibiotique. Des lapins seront également nécessaires à la mise au point du modèle de pneumonie pour chaque souche ainsi que pour la mise au point des différentes pharmacocinétiques. Un suivi de la virulence des souches bactériennes sera également nécessaire à raison de 2 lapins par souche et par mois.

Au total pour cette étude, 200 lapins New Zealand seront nécessaires. Une appréciation rétrospective sera effectuée à la fin du projet avec le comité d'éthique.

5332. La production de gaz à effet de serre (GES) dans les systèmes de production de ruminants est particulièrement préoccupante en raison de leur implication dans le changement climatique mondial. Parmi les GES, le méthane est produit dans le rumen par la fermentation microbienne anaérobie de composants d'alimentation.

Les ruminants sont la principale source agricole de ce gaz à effet de serre puissant qui a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO<sub>2</sub>. La production de méthane représente aussi une perte d'énergie pour l'animal de 6% à 8% de l'apport alimentaire.

La réduction des émissions de méthane entérique est donc un objectif important en production de ruminants.

L'objectif de cette étude est de tester un inhibiteur de la méthanogenèse entérique, le 3-nitrooxypropanol (3NOP), chez la vache laitière en lactation.

L'expérimentation proposée suit les recommandations nécessaires pour une demande d'autorisation de mise sur le marché dans l'Union Européenne et les USA. L'efficacité du 3NOP a été montrée par plusieurs laboratoires à travers le monde. Pour le dossier d'enregistrement, l'entreprise productrice du 3NOP a réalisé les études de sécurité et toxicité requis, et le produit ne présente a priori pas de problèmes de sécurité pour les manipulateurs et pour les animaux.

L'expérimentation proposée ne peut pas être remplacée par des modèles in vitro, mais la méthodologie choisie tient compte des autres critères demandés par la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement valides (28 vaches laitières en lactation), raffinement des conditions de vie et d'expérimentation des animaux (hébergement en stabulation libre avec logettes, étable habituelle, avec leurs congénères habituels, selon leur rythme de vie habituel, et manipulation par des agents compétents, que les animaux connaissent depuis leur naissance).

5333. Ce projet a pour but la production d'anticorps monoclonaux de souris. La valeur des anticorps monoclonaux de souris en tant qu'outils diagnostiques et thérapeutiques est maintenant clairement établie. Notre équipe dispose depuis plus de 20 ans d'une expertise dans la production d'anticorps monoclonaux de souris à visée diagnostique. Cette production fait appel à la technique établie par les docteurs Köhler et Milstein, qui ont reçu le prix Nobel de physiologie en 1984. Elle nécessite, afin de stimuler le système immunitaire de la souris et donc obtenir une réponse par synthèse d'anticorps, l'immunisation de souris immunodéficientes de souche Balb/C avec des cellules tumorales humaines. La spécificité développée par notre équipe est l'étape de sélection des anticorps monoclonaux produits qui se fait directement sur des coupes de xénogreffes (1) fixées et incluses en paraffine afin d'être au plus-près de l'utilisation finale de l'anticorps produit. Les cellules tumorales humaines utilisées pour l'immunisation des souris immunodéficientes sont alors greffées à des souris immunodéprimées Nude ou SCID ou NOD-SCID ou NSG par injection en sous-cutanée. De par notre expérience acquise au cours des différentes productions réalisées dans l'équipe, nous avons déterminé quelle souche de souris immunodéprimées doit être utilisée selon la nature des cellules tumorales à xénogreffer.

A ce jour, seule l'utilisation des souris permet de produire des anticorps monoclonaux de grande affinité et de grande spécificité utilisables à la fois comme outils diagnostiques et thérapeutiques.

L'ensemble de ces étapes nécessite l'utilisation de 1200 souris immunodéficientes.

Durant toute la période d'expérimentation, afin de limiter la souffrance des animaux, l'état général des animaux sera observé attentivement et en cas de souffrance ils seront traités par analgésiques (ibuprofène en solution dans l'eau de boisson, à 0.05 mg/ml (~7.5 mg/kg/jour), dès la veille et jusqu'à 3 jours après une ponction) ou euthanasiés, si nécessaire. Le week-end le suivi des animaux sera assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie. Un enrichissement de type Nestlet (carré de coton) sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire une nidation. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3 R (remplacement, réduction et raffinement) et la directive européenne 2010/63/UE.

5334. La production de gaz à effet de serre (GES) dans les systèmes de production de ruminants est particulièrement préoccupante en raison de leur implication dans le changement climatique mondial. Parmi les GES, le méthane est produit dans le rumen par la fermentation microbienne anaérobie de composants d'alimentation. Les ruminants sont la principale source agricole de ce gaz à effet de serre puissant qui a un potentiel de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO<sub>2</sub>. La production de méthane représente aussi une perte d'énergie pour l'animal de 6% à 8% de l'apport alimentaire. La réduction des émissions de méthane entérique est donc un objectif important en production de ruminants.

L'objectif de cette étude est de tester l'efficacité d'un aliment fermenté pour réduire le méthane entérique chez la vache laitière en lactation.

Plusieurs expérimentations précédentes (in vitro + preuves de concept sur modèle ovin et sur un nombre réduit de vaches non-productives) ont montré que cet aliment fermenté ne présente a priori aucun problème de sécurité pour les manipulateurs ni pour les animaux. Nous n'avons d'ailleurs constaté aucun effet négatif dans aucune de nos études précédentes.

L'expérimentation proposée ici ne peut pas être remplacée par des modèles in vitro, mais le nombre d'animaux (16 vaches laitières en lactation) et la méthodologie choisie tiennent compte des critères de réduction et raffinement de la règle des 3R.

5335. Le vieillissement de la population engendre une constante augmentation du nombre de patients atteints de maladies neurodégénératives chroniques, telle que la maladie d'Alzheimer. Ce domaine médical souffre d'un manque de thérapeutiques capables de ralentir le développement de la maladie. Le lien entre les dysfonctionnements métaboliques et les maladies neurodégénératives est un axe de recherche particulièrement innovant. Ce projet est destiné à mettre en œuvre des modèles animaux mimant les phénomènes mis en jeu dans ces pathologies, afin d'identifier des cibles thérapeutiques, d'évaluer les traitements médicamenteux innovants issus de la recherche et d'identifier des biomarqueurs qui pourront être utilisés lors des essais cliniques. Ces modèles sont développés chez les rongeurs (rat et souris). Ce sont les espèces les plus couramment utilisées dans le domaine des maladies neurodégénératives et dans celui des dysfonctionnements métaboliques. Elles présentent l'avantage

de fournir des souches stables et bien caractérisées ce qui permet une bonne reproductibilité et une optimisation du nombre d'animaux à inclure dans les études. Par ailleurs, la proximité des mécanismes de régulation métabolique et la possibilité de mimer l'alimentation occidentale par une surcharge calorique en lipides et en sucres, rendent ces espèces particulièrement intéressantes. La nécessité d'utiliser ces 2 espèces est liée à des sensibilités différentes d'espèces aux différents modèles et tests comportementaux, et au fait que la souris est l'espèce la plus couramment utilisée pour le développement d'animaux transgéniques particulièrement utiles dans le domaine des maladies neurodégénératives.

Ces modèles concernent des études de courte, moyenne ou longue durée (plusieurs mois). Dans tous les cas, il s'agira de modéliser des mécanismes physiopathologiques précis impliqués afin de valider les cibles biologiques travaillées et/ou d'induire un développement progressif des phénomènes de neuro-dégénérescence afin de s'approcher au plus près du décours temporel de ces pathologies en les associant à des dérèglements métaboliques induit ou génétiquement acquis.

La complexité du cerveau et des processus associés à l'intégration mnésique, sa capacité de plasticité et la nécessaire intégration dynamique des différents acteurs centraux et périphériques, rendent le recours à l'animal indispensable. L'utilisation croisée de modèles de neuro-dégénérescence dans lesquels seront étudiés les défauts métaboliques par des tests de sensibilité à l'insuline par exemple et de modèles de maladies métaboliques dans lesquels seront évalués les défauts cognitifs par exemple par les tests de cognition permettra une analyse fine et complète des cibles et tests envisagés.

Notre établissement s'attache à réduire au maximum l'usage des animaux dans le développement de nouvelles thérapeutiques. Ainsi les candidats-médicaments ne sont évalués dans ces modèles qu'après un tri important via des méthodes de biochimie et biologie cellulaire in vitro, permettant de retenir les candidats les plus prometteurs, qui présentent le meilleur index thérapeutique in vitro (rapport/activité toxicité potentielle). De plus ces modèles incluent la mesure de nombreux paramètres permettant d'évaluer en parallèle plusieurs composantes de la maladie et réduisant par la même le nombre d'animaux. Ces informations sont nécessaires et indispensables pour la mise en œuvre des futurs essais cliniques de façon pertinente et maximiser leur probabilité de succès. De même, l'identification des cibles d'intérêt et de biomarqueurs pronostiques de la maladie chez l'homme permettront d'augmenter la prédictivité de nos modèles et de réduire le nombre d'animaux utilisés. Un support du service des biostatistiques est apporté aux expérimentateurs pour l'élaboration du design expérimental, pour optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques afin de garantir la qualité des résultats. Enfin, l'utilisation de l'imagerie in vivo en conditions d'anesthésie, permet des approches longitudinales, et concoure au respect des consignes éthiques de réduction et de raffinement.

Nous nous attachons à améliorer les conditions des études en optimisant les conditions d'hébergement (en particulier par l'enrichissement adapté aux besoins des rongeurs), en réduisant les contraintes de traitement par incorporation des produits dans la nourriture ou l'eau de boisson pour les études chroniques, en privilégiant les modèles transgéniques à phénotype non-dommageable, en utilisant les anesthésiques et analgésiques les mieux appropriés en cas de geste invasif pour préserver la validité du modèle tout en réduisant les douleurs. Les phénomènes de neuro-dégénérescence centrale pas plus que les dérèglements métaboliques ne produisent par eux-mêmes de phénomènes douloureux. Cependant une attention particulière est portée sur le suivi comportemental de l'animal en favorisant l'enrichissement et le suivi de sa consommation alimentaire et hydrique ainsi que sa prise de poids. Pour l'ensemble des procédures des points limites généraux et spécifiques sont identifiés. Cela permet au personnel en charge des expérimentations et des soins aux animaux (formé à l'observation des signes cliniques) d'identifier rapidement toute manifestation inattendue et de prendre les mesures nécessaires dans l'intérêt de l'animal.

Ces études sont conçues et mises en œuvre par des personnels experts scientifiques formés spécifiquement à l'observation des animaux, et en lien constant avec les personnels de soins aux animaux, et les vétérinaires de l'établissement.

Le nombre maximal d'animaux utilisé dans le cadre de ce projet est estimé à 30 000 rongeurs.

5336. La douleur aiguë est un processus physiologique nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires importants. Il faut donc découvrir de nouveaux médicaments, et pour ce faire, étudier les mécanismes responsables d'une douleur chronique.

Au cours des dernières années, notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires de la douleur s'est considérablement accrue. Pourtant, aucune avancée thérapeutique majeure n'est intervenue. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs. En effet, qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement non douloureuses (allodynie) ou normalement déjà douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts. Aussi, un médicament efficace sur les douleurs spontanées ne le sera pas nécessairement, par exemple, sur l'allodynie et inversement. D'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun de ces symptômes. Avec les douleurs spontanées et l'hyperalgésie, l'allodynie fait partie des symptômes cliniques fréquemment rencontré à la suite d'une inflammation ou une lésion du système nerveux périphérique ou central. Les opioïdes sont de puissants analgésiques largement utilisés pour le traitement de la douleur. Ces composés agissent sur 3 types de récepteurs opioïdes :  $\mu$  (mu), (kappa) et (delta). Cependant, les données concernant l'efficacité des agonistes des récepteurs delta opioïdes sur les allodynies mécaniques trigéminales sont peu nombreuses et contradictoires. Le projet vise ici à évaluer l'efficacité d'un agoniste delta sur l'allodynie mécanique trigéminale dans un modèle de douleur inflammatoire persistante de la face chez le rat (injection intradermique d'adjuvant complet de Freund CFA) à deux délais : avant l'initiation de l'allodynie mécanique et 3 jours après son installation.

Le projet doit permettre de vérifier si la mise en jeu des récepteurs opioïdes delta constitue une cible thérapeutique potentielle pour le traitement de l'allodynie mécanique trigéminal

Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum (5 à 10 rats par groupe) en ne répétant pas certains groupes témoins déjà disponibles dans la littérature antérieure. L'approche comportementale mesurera les effets de l'agoniste sur l'allodynie mécanique (statique) induite par injection de CFA. La douleur étant un phénomène très intégré nécessitant une intégrité des réseaux neuronaux centraux, il n'existe pas de méthodes alternatives ni de substitutions pour mener à bien ce projet, ceci justifiant ainsi l'utilisation d'animaux vivants.

Sachant que cette étude, du fait même de sa nature, ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'association internationale pour l'étude de la douleur puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. De plus, pendant la période post CFA, toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie... mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une euthanasie par injection létale d'anesthésique

En vue de l'application de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés pour ce projet a été réduit au maximum. Ce nombre tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non paramétrique). Au total 40 rats seront utilisés dans ce projet. Ils seront euthanasiés après la fin des protocoles par overdose anesthésique.

5337. La nucléoline (NCL) est une protéine indispensable, présente dans toutes les cellules chez les vertébrés et les plantes. NCL a été formellement impliquée dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux se déroulant dans différents compartiments cellulaires et dans de nombreuses situations pathologiques. Par exemple, de multiples liens existent entre NCL et l'initiation et la progression des cancers. Plusieurs études montrent que le gène codant NCL peut être considéré comme un proto-oncogène (favorisant la survenue et le développement de cancers) et agir en synergie avec d'autres oncogènes dans le processus tumoral. Récemment, NCL a été montré comme importante pour la réparation de l'ADN, mécanisme clé des processus oncogéniques.

Ses fonctions, très diverses, restent mal comprises. Seules des données expérimentales obtenues in vitro et in cellulo sont disponibles. Elles ne permettent pas de déterminer la fonction de cette protéine au cours du développement précoce normal, ni dans le fonctionnement d'organes spécifiques ou dans la progression tumorale. Une étude sur l'animal est désormais indispensable. La souris est ici le modèle de choix. NCL est très conservée entre la souris et l'homme (>90 % d'identité) et il est relativement aisé de réaliser l'inactivation du gène Ncl pour mieux en appréhender les nombreuses fonctions chez la souris comme chez l'homme. Par ailleurs, des études complémentaires in cellulo seront poursuivies pour minimiser le nombre d'animaux utilisés.

Etant donné le caractère essentiel de NCL démontré dans tous les modèles testés in cellulo, nous pensons qu'il est impossible d'établir une lignée portant 2 allèles invalidés de Ncl. Aussi, nous établirons des lignées qui permettront d'interrompre le gène Ncl à certains stades du développement et dans certains tissus. Nous étudierons les effets de l'absence totale ou partielle de la protéine dans différents groupes de souris. Nous étudierons l'importance de NCL dans la réparation de l'ADN. Nous établirons aussi des lignées de souris portant la mutation à l'état hétérozygote qui serviront de contrôle.

L'ensemble des procédures requiert l'utilisation de 615 animaux, ce nombre est réduit au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables.

Pour les procédures susceptibles de générer de l'inconfort et de la souffrance, les animaux seront surveillés quotidiennement par les chercheurs; pour les autres procédures les animaux seront observés 1 à 2 fois par semaine. Dans tous les cas, l'état des animaux sera évalué par des critères qualitatifs (aspect général, motricité...) et/ou quantitatifs (poids) prédéfinis. Des limites dans l'évolution clinique sont posées. Leur dépassement entraînera l'euthanasie des animaux selon les procédures réglementaires. L'observation de groupes témoins permettra une analyse statistique des résultats. De nombreux paramètres cellulaires et moléculaires seront analysés sur chaque animal euthanasié afin de minimiser le nombre d'animaux impliqués.

A terme, le projet nous permettra de mieux connaître le rôle de NCL dans le développement normal et aussi dans les processus tumoraux.

5338. Notre service propose aux équipes de recherches académiques régionales et nationales différentes prestations : la création de modèles murins génétiquement modifiés, la décontamination de lignées murines par transfert d'embryons (redériver) et l'archivage de lignées murines (cryopréservation).

L'une des thématiques principales des utilisateurs de notre plateforme est l'immunité. Par conséquent, les animaux hébergés présentent souvent des déficiences immunitaires. Dans ce contexte, il est essentiel que certains microorganismes soient exclus des zones d'hébergements afin que ces animaux, particulièrement sensibles, ne développent pas de pathologies pouvant remettre en cause leur bien-être et/ou de réponse immunitaire susceptible d'interférer avec les résultats. La redériver est donc un outil essentiel participant au raffinement de l'expérimentation animale.

En fonction de l'évolution des thématiques de recherche, certaines lignées sont amenées à ne plus être utilisées pendant des périodes plus ou moins variables. La cryopréservation de ces lignées murines est donc un moyen de conserver ces souris sans les garder sous une forme respirante. De plus, cet archivage est une garantie en cas de problème génétique ou sanitaire survenant sur les animaux de la lignée. La cryopréservation des lignées participe donc à la réduction des animaux utilisés en expérimentation animale.

Les techniques de transgénèses permettent de modifier le patrimoine génétique de la souris. On peut ainsi sur exprimer, invalider ou modifier une protéine afin de comprendre son rôle au sein de l'organisme. De plus, l'expression qualitativement ou quantitativement anormale d'un gène peut également aboutir à l'obtention d'un modèle pathologique pertinent.

Par exemple, l'étude de mécanismes biologiques complexes tels que la mise en place du système immunitaire, ou le mécanisme d'action des oncogènes, nécessitent l'obtention de nombreux modèles murins génétiquement modifiés. La plupart du temps, ces études ne peuvent être réalisées qu'in vivo car cela implique de multiples régulations et interactions cellulaires.

Les techniques de transgénèse chez la souris sont nombreuses et efficaces. La souris est un mammifère suffisamment proche de l'homme et facile à manipuler. Notre structure met à la disposition des chercheurs l'ensemble de ces outils.

Dans le cadre de ces prestations, nous nous attachons à toujours choisir la technique la plus pertinente et la plus efficace de manière à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Les opérations chirurgicales réalisées (vasectomies, transfert d'embryons) sont réalisées en conditions stériles, sur des animaux anesthésiés recevant un traitement antalgique approprié. Les animaux sont, de plus, surveillés quotidiennement.

3914 souris seront utilisées au cours des 5 ans à venir pour la réalisation de ces différentes techniques.

5339. Le tractus digestif humain héberge une flore résidente appelée microbiote qui joue un rôle fondamental dans la physiologie intestinale. Il est maintenant clairement établi que la composition du microbiote intestinal est modifiée en conditions pathologiques (cancer, maladies inflammatoires intestinales...). Ces modifications appelées dysbioses sont par ailleurs suspectées de jouer un rôle prépondérant dans le déclenchement/l'entretien de maladies digestives ou autres. Un des enjeux majeurs à l'heure actuelle est de mieux comprendre les facteurs induisant une modification de la flore intestinale de manière à prévenir la dysbiose. Il a par exemple été montré que l'alimentation et la composition du microbiote étaient clairement liées. Dans le mode de vie occidental une des modifications majeures dans l'alimentation a été l'introduction massive des boissons sucrées avec des consommations moyennes dans certains pays pouvant représenter 20-30% de la consommation de boissons. Le but de notre étude est de mieux comprendre l'impact de ces boissons sur la composition du microbiote intestinal ainsi que ses conséquences physiopathologiques.

Pour cela, nous utiliserons des souris sauvages femelles âgées de 6 à 8 semaines provenant d'un élevage. Après acclimatation dans l'animalerie de notre université, plusieurs lots seront constitués et chacun recevra soit de l'eau soit une eau supplémentée en différentes boissons sucrées commerciales et cela pendant une durée totale de 6 semaines. Dans le cadre de la règle des 3R, nous collecterons des fèces toutes les semaines pour déceler des variations de composition de la flore au cours du temps. De plus, à la fin de l'expérience, les animaux seront sacrifiés, l'ensemble du tractus digestif sera collecté afin de réaliser une étude complète de l'impact du traitement sur la physiologie du tube digestif (développement des enzymes digestifs, la réponse inflammatoire, la perméabilité intestinale...). La rate des animaux sera également prélevée de manière à explorer le répertoire immunitaire des animaux. En application du principe des 3R, le nombre d'animaux sera limité à 10 par groupes expérimentaux. 4 boissons représentatives, qui diffèrent par leur composition notamment en sucre, seront testées. Un total de 50 animaux sera utilisé.

Les animaux seront observés tous les jours et pesés une fois par semaine durant toute la durée de l'expérience afin de nous assurer de leur bien-être. Nous n'anticipons aucune aucun stress, perte de poids. Cependant, au moindre signe de stress/douleur, l'animal en question sera isolé et du paracétamol lui sera administré par gavage de manière à nous en assurer de sa prise (100 mg/kg). Si une perte de poids supérieure ou égale à 10% du poids total de l'animal est observée, l'animal sera euthanasié. Enfin, si un comportement anormal (vocalise, prostration...) était repéré, l'animal serait immédiatement euthanasié.

L'enrichissement du milieu est également prévu avec notamment l'utilisation de maisonnette en carton dans les cages.

5340. Les maladies cardiovasculaires ischémiques constituent l'une des premières causes de décès dans les pays développés. L'infarctus du myocarde est déclenché par l'obstruction de l'artère coronaire qui alimente le cœur en sang et donc en oxygène. Sans l'oxygène, les cellules du muscle cardiaque (myocarde) meurent rapidement en entraînant des troubles du rythme, une insuffisance cardiaque, voire l'arrêt du cœur. La rapide reperfusion de la zone affectée est essentielle pour réduire les conséquences de l'infarctus.

Un processus physiologique permettant la reperfusion est de favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les microparticules (MPs), petites vésicules obtenues par bourgeonnement cellulaire et portant à leur surface un marqueur spécifique (MPsShh+) sont capables d'améliorer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau sanguin pré-existant permettant la reperfusion. De plus, les MPsShh+ diminuent la mort cellulaire par apoptose des cellules constituant les vaisseaux sanguins comme les cellules endothéliales.

L'objectif de ce projet est de déterminer si les MPs sont capables de limiter les séquelles de l'obstruction de l'artère coronaire en les injectant le plus tôt possible après un infarctus du myocarde.

Pour vérifier que les effets observés sont dues au marqueur porté par les MPsShh+, nous allons également utiliser (1) l'inhibiteur de ce marqueur (la cyclophosphamide) et (2) des MPs qui ne portent pas de marqueurs spécifiques sur des rats qui recevront les mêmes procédures expérimentales. En fin, nous allons également constituer un groupe de rats témoin qui recevront les mêmes procédures expérimentales afin d'obtenir des contrôles non traités. Trois doses des MPs seront testées. Le modèle de ligature de l'artère coronaire chez le rat sera utilisé. Pour cette étude un total de 200 animaux (10 groupes de 20 rats) sera utilisé. Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés. L'induction de l'ischémie du myocarde a un caractère de stricte nécessité et ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum (n=20 par groupe) sans compromettre les objectifs du projet.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Une grille présentant les points limites sera utilisée pour déterminer la conduite à tenir.

Ces données devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes protecteurs des MPShh+et envisager leur utilisation en thérapeutique.

5341. L'Université propose aux étudiants concernés (masters 2 et thésards) une formation diplômante et réglementaire de niveau 2 en expérimentation animale. Les travaux pratiques sur animaux vivants font partie intégrante de la formation. Dans un premier temps les animaux sont manipulés sans qu'il ne soit effectué de gestes techniques contraignants pour que les étudiants apprennent à gérer leurs propre stress et rassurer l'animal en habituant celui-ci à main de l'homme. Puis nous apprenons aux étudiants à réaliser les deux gestes qui nécessitent que l'animal soit vigile : le gavage pour conserver le réflexe de déglutition et l'injection en intra péritonéale pour anesthésier les animaux.

Le reste des gestes techniques que nous enseignons (pesée, marquage, injection intraveineuse, intramusculaire, prélèvements etc.) se fera sur des animaux anesthésiés. Le dernier geste sur animaux vivant est l'injection intracardiaque pour euthanasier les animaux par un surdosage de Thiopental.

Les cadavres nous servent ensuite pour effectuer des travaux pratiques d'anatomie.

Cette formation s'adresse à 2 groupes de 15 étudiants chacun par an et ceux-ci bénéficient de 4 TP en comptant l'examen final il nous faudra donc 120 rats et autant de souris par année universitaire. Cela représente un total de 1200 animaux pour les cinq prochaines années scolaires.

La règle des 3 R, avec remplacement, réduction et raffinement, qui est mise en pratique lors de ces travaux pratiques est enseignée aux étudiants lors des cours qui leurs sont dispensés pour l'obtention du niveau 2 en expérimentation animale et leur est constamment rappelée en situation, au cours des travaux pratiques.

5342. Nous avons montré que l'anticorps anti-CD45RC était capable d'inhiber la maladie du greffon-versus-l'hôte (GVHD), une complication fréquente et grave lors de greffes de moelle osseuse réalisées dans le cadre du traitement des leucémies ou des lymphomes. La GVHD est le produit d'une attaque de l'hôte par les cellules T présentes dans la moelle osseuse et l'élimination de ces lymphocytes T permet de prévenir la GVHD mais cela a comme conséquence la perte de la réaction de la greffe versus-tumeur (GVT) et le pourcentage de rechute de leucémie ou lymphome augmente à un niveau inacceptable. Il faut donc développer de nouveaux traitements permettant d'inhiber la GVHD sans affecter la GVT. L'objet de cette saisine est d'évaluer si le traitement avec l'anticorps anti-CD45RC humain permettant d'inhiber la GVHD affecte la GVT. Pour cela nous injecterons en sous-cutanée des souris NSG avec 1 lignée tumorale déjà définie et une fois que les tumeurs seront détectables (quelques jours après implantation) nous injecterons des PBMCs humains de sujets sains qui devraient dans le groupe contrôle (anticorps isotype identique) rejeter les tumeurs par GVT avant la survenue d'une GVHD (caractérisée par une perte de poids) tandis que les animaux traités avec l'anti-CD45RC devraient avoir une GVHD retardée et la GVT est l'objet de l'étude. Tous ces paramètres ont déjà été définis mais ils ne peuvent pas être détaillés d'avantage pour des raisons de confidentialité (un manuscrit est en train d'être soumis pour publication).

Dans cette saisine, la règle des 3R a été suivie comme suit :

- Remplacer : Des études fonctionnelles ont été réalisées in vitro à partir de cellules humaines, les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique et de la complexité du système immunitaire et ne peuvent remplacer les études in vivo. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immunorégulatrice de la molécule dans un modèle vivo proche de l'Homme. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris dites «humanisées».

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 15 (2 groupes, total n=30), nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (Log Rank test pour les courbes de survie). Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

-Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal-être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids, le développement de la GVHD et du rejet de la tumeur et des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec l'anti-CD45RC et ceux du groupe contrôle seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les tumeurs dues à la réaction de GVT et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique de l'anticorps anti- CD45RC humain sur les réponses immunes intervenant dans des contextes de GVHD et GVT et de mieux comprendre ses mécanismes d'action par les analyses des souris traitées. Cette étude est soutenue par la SATT Ouest- Valorisation, l'utilisation d'un anticorps anti- CD45RC faisant l'objet d'un brevet quant à son potentiel thérapeutique prometteur dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de la GVHD mais aussi pour le traitement de maladies auto-immunes. La validation de la molécule dans ce modèle préclinique de souris humanisée est la dernière étape indispensable avant les tests cliniques.

5343. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité thérapeutique de 3 nouveaux candidats médicaments administrés par voie orale et par voie topique dans un modèle murin de dermatite atopique induite par l'application d'un extrait protéique d'acarien.

Les 3 candidats médicaments testés dans ce protocole sont des inhibiteurs de ROR $\gamma$ t et l'activité thérapeutique de ces composés sera comparée à celle d'un médicament de référence (corticoïde=triamcinolone acetonide). Afin de documenter l'implication de la réponse Th17 dans ce modèle, l'effet d'un anticorps anti IL-17 sera également évalué.

Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le mieux adapté pour le développement de modèles immunologiques. Nous utiliserons un modèle murin de dermatite atopique permettant l'étude des mécanismes physiopathologiques qui gouvernent l'induction et le contrôle de la maladie, ainsi que de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisées tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 84 souris. Le protocole est planifié de telle sorte que plusieurs analyses sont réalisées sur le même animal. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier, d'une maisonnette et de tubes en plastique) et des mesures d'antalgie seront appliquées en tant que de besoin. L'étude conduite dans ce projet ne peut être conduite qu'in vivo et fait suite à un package d'études in vitro qui ont illustré l'activité anti inflammatoire de ces composés (remplacement).

5344. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité thérapeutique de 3 nouveaux candidats médicaments administrés en topique dans un modèle murin de dermatite atopique induite par l'application d'un extrait protéique d'acararien. Les 3 candidats médicaments testés dans ce protocole sont des antagonistes de CGRP et l'activité thérapeutique de ces composés sera comparée à celle d'un médicament de référence (corticoïde=triamcinolone acetonide).

Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le mieux adapté pour le développement de modèles immunologiques. Nous utiliserons un modèle murin de dermatite atopique permettant l'étude des mécanismes physiopathologiques qui gouvernent l'induction et le contrôle de la maladie, ainsi que de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 150 souris. Le protocole est planifié de telle sorte que plusieurs analyses sont réalisées sur le même animal. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier, d'une maisonnette et de tubes en plastique) et des antalgiques permettront de prendre en charge la douleur le cas échéant. L'étude conduite dans ce projet ne peut être conduite qu'in vivo et fait suite à un package d'études in vitro qui ont illustré l'activité anti inflammatoire de ces composés (remplacement).

5345. Aujourd'hui, les vaccins antigrippaux sont la pierre angulaire de la prévention de la grippe avec environ 500 millions de doses administrés chaque année. Cependant, avec plus de 250 000 décès par an, la grippe reste un fardeau médical lourd et il y a encore des besoins non satisfaits, avec deux éléments clés :

- 1) la protection des populations âgées qui ne répondent pas bien aux vaccins actuels,
- 2) la nécessité d'une protection croisée contre plusieurs virus de la grippe qui seraient modifiés en raison de la dérive antigénique (changements observés lors des variations saisonnières) ou de cassure antigénique (de profonds changements en raison de l'émergence d'un nouveau virus pandémique).

Ce projet a pour objectif d'améliorer les vaccins actuels contre la grippe, en ouvrant la voie vers le développement clinique d'un nouveau candidat-vaccin. Ce projet de recherche permettra donc d'évaluer l'efficacité de nouveaux candidats-vaccin et de comprendre les réponses immunitaires induites, afin de mieux traiter les patients atteints de grippe. La compréhension de l'organisation spatiale, et notamment le trafic des lymphocytes entre différents organes lors d'une vaccination et la génération d'une mémoire immunitaire efficace est ici primordiale. C'est pourquoi, suite aux données préliminaires obtenues, le modèle expérimental chez la souris est indispensable et ne peut pas être remplacé. En effet, la réponse immunitaire est un phénomène biologique complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires et une organisation spatiale unique qui rend impossible son étude dans des tests in vitro. Suite aux résultats obtenus au laboratoire, le modèle expérimental chez la souris a permis de mettre en évidence plusieurs acteurs de la réponse immunitaire associée à la vaccination. Afin de comprendre les mécanismes permettant une protection efficace contre la grippe, il est maintenant nécessaire d'identifier le rôle de chacun des acteurs. Pour ce projet, le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire à l'interprétation statistique des résultats des diverses expériences. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 44 souris au maximum.

5346. L'allergie alimentaire constitue un problème majeur de santé publique du fait de sa prévalence et de la gravité des symptômes qu'elle engendre. Les mécanismes immunitaires conduisant à la sensibilisation et à l'allergie sont encore mal connus bien qu'il semble que la peau pourrait être une voie de sensibilisation. Cependant, la voie cutanée est également impliquée dans l'induction de tolérance, plus particulièrement au cours de la désensibilisation épi-cutanée, traitement actuellement testé en phase III clinique chez les patients allergiques à l'arachide.

Dans ce cadre, nous souhaitons étudier les mécanismes immunitaires au niveau de la peau et des organes immunitaires associés (ganglions, rate) impliqués dans ces phénomènes de sensibilisation et/ou de désensibilisation afin de les comprendre et de pouvoir possiblement intervenir dessus.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisées tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 1000 souris, âgées de 5 semaines. Le protocole est planifié de telle sorte que toutes les analyses sont réalisées sur le même animal (i.e. analyses de la réponse immunitaire dans la peau et les organes immunitaires). Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier, d'une maisonnette et de tubes en plastique). Des mesures d'antalgie seront prévues pour prendre en charge la douleur le cas échéant. Aucun test *in vitro* (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie.

5347. 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. 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 biomarqueurs plasmatiques et fécaux qui soient corrélés avec la variabilité individuelle de l'efficacité alimentaire et de l'utilisation de l'azote chez l'espèce cible, le bovin (*Bos taurus*, race Charolaise) en croissance – engraissement. En respect de la règle des 3Rs, il est proposé de réaliser cette étude en minimisant le nombre d'interventions sur chaque animal (8 prises de sang au cours des 10 mois d'engraissement) en raffinant les conditions d'hébergement, conduite des animaux en lot et en stabulation libre et sur un nombre réduit mais suffisant d'animaux (n = 50 chaque année donc 250 animaux maximum pour la totalité du projet) pour mettre en évidence les relations recherchées. De plus, les prélèvements ne devraient pas générer de souffrance à l'animal. Cependant, si des signes de douleur au moment du prélèvement étaient observés (agitation, sensibilité au toucher), la suspension des prélèvements serait décidée le temps que le problème soit résolu. De plus pour réduire la souffrance et tout risque d'infection lors de la réalisation de la procédure la plus invasive (biopsie de tissu adipeux) sur l'animal, une administration d'un anesthésique local puis d'un antiseptique sera faite systématiquement au moment du prélèvement.

5348. L'objectif de ce projet est d'étudier la composition et les fonctions des communautés microbiennes du tube digestif du ruminant ainsi que l'impact de facteurs abiotiques (facteurs alimentaires par exemple) ou biotiques (additifs à base de microorganismes – probiotiques, bactéries pathogènes pour l'homme mais hébergées dans le tube digestif animal). Ces études nécessitent des étapes de tests *in vitro* dans lesquels du contenu digestif (contenu de rumen ou fécès) est incubé dans différentes conditions, ce qui permet de mesurer l'évolution du microbiote, des fermentations, et la survie de bactéries pathogènes inoculées *in vitro*. Ces méthodes permettent de s'affranchir de l'utilisation d'un grand nombre d'animaux, et évitent l'inoculation *in vivo* de pathogènes qui demande des conditions de confinement très contrôlées, lourdes et coûteuses. Afin de réaliser ces incubations *in vitro*, nous aurons besoin de 2 vaches équipées de canules ruminales qui seront utilisées comme animaux donneurs de contenu ruminal et de fécès, sur une période de 19 mois, les prélèvements étant effectués sur un rythme de 1 à 2 par semaine.

Par ailleurs, l'objectif de nos études *in vitro* est surtout de réaliser des tests préliminaires d'efficacité de différents additifs sur l'activité du microbiote ou de pathogènes, qui pourront être suivis de tests *in vivo* sur un plus large effectif d'animaux. Ainsi notre approche est en accord avec la règle des 3R : remplacement, car il s'agit ici d'utiliser comme modèle l'espèce cible, réduction du nombre d'animaux en expérimentation qui sont donc remplacés par des systèmes *in vitro*, raffinement des mesures par la répétition des manipulations (un grand nombre de réplicats est possible). De plus, les prélèvements de contenu de rumen via la canule ou de fécès par fouille rectale ne prennent que quelques minutes et ne devraient pas générer de souffrance à l'animal. Cependant, si des signes de douleur au moment du prélèvement étaient observés (agitation, sensibilité au toucher), la suspension des prélèvements serait décidée le temps que le problème soit résolu.

5349. Les anémies inflammatoires sont extrêmement fréquentes chez les patients souffrant d'infection, de maladies auto immunes ou de cancer. Elles sont extrêmement péjoratives pour le patient car elles entraînent une mauvaise réponse au traitement et un affaiblissement rapide. Il n'existe pas de traitement efficace. Ces anémies sont causées par une augmentation de l'expression de l'hepcidine qui entraîne une restriction de la biodisponibilité du fer systémique et une diminution de l'absorption du fer alimentaire par le duodénum. Ceci limite la production de globules rouges par la moelle osseuse. Les signaux qui augmentent l'expression de l'hepcidine lors d'une inflammation ne sont pas connus.

D'autre part, l'hémochromatose est une maladie fréquente en Europe de l'ouest qui est causée par une surcharge en fer intra hépatique. Cette surcharge est due à une mauvaise régulation de l'entrée du fer via le duodénum. Les mécanismes moléculaires impliqués dans ces pathologies sont mal connus. Il est donc important de mettre au point des modèles *in vivo* qui permettront d'identifier les signaux de régulation mis en jeu. Nous utilisons pour cette recherche une dizaine de lignées de souris délétées pour des gènes impliqués dans la régulation du métabolisme du fer. Nous utiliserons environ 5340 souris en 5 ans.

La règle des 3 R : Remplacer, Réduire, Raffiner, sera appliquée :

Remplacer: lorsque cela est possible des modèles *in vitro* seront utilisés, toutefois le projet présenté nécessite d'utiliser des animaux vivants présentant un système physiologique intégré.

Réduire: Le nombre de souris utilisé dans chaque expérience a été calculé à minima en tenant compte de la variance biologique des résultats obtenus. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés tous les échantillons prélevés sont stockés à -80°C et répertoriés dans une banque de données. Ils peuvent être réutilisés dans des expériences ultérieures, servir de témoins pour de nouvelles expériences ou transmis à d'autres laboratoires de recherche.

Raffiner: le modèle de souris utilisé est choisi avec soin en fonction de la question posée afin d'apporter le plus de résultats possible, les protocoles sont soigneusement planifiés, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés à l'aide de procédures appropriées.

5350. Notre projet de recherche vise à développer des stratégies thérapeutiques innovantes applicables aux pathologies d'origine génétique pour lesquelles il n'existe aucun traitement. Nous nous intéressons plus particulièrement aux maladies neuromusculaires comme la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).

Nos stratégies se basent sur des approches de thérapie génique, c'est-à-dire le transfert de gènes thérapeutiques dans les tissus cibles, et sur des stratégies antisens, utilisant des molécules oligonucléotidiques capables d'interférer avec la machinerie génétique des cellules pour rétablir l'expression de la protéine à l'origine défectueuse. Plusieurs types de vecteurs de gènes (viraux et non viraux) et d'oligonucléotides antisens sont évalués dans le cadre de ces stratégies. L'ensemble de ces outils moléculaires est tout d'abord évalué *in vitro* (remplacement) afin de sélectionner les candidats les plus prometteurs et de remplacer autant que possible l'évaluation *in vivo* (réduction). Le développement préclinique des molécules les plus prometteuses requiert cependant une évaluation thérapeutique *in vivo* sur des modèles murins appropriés et nous utilisons pour cela 3 modèles murins de la DMD ainsi qu'une souche de souris contrôle. Ce projet de recherche d'une durée de 5 ans requiert l'utilisation de 1000 souris par an au maximum. Les modèles murins utilisés dans ce projet présentent des phénotypes très peu dommageables et les procédures employées ont toutes pour objectif de corriger le phénotype pathologique des animaux. Ce projet de recherche translationnelle vise à développer des candidats cliniques pour le traitement de la DMD et leur évaluation préclinique sur des modèles murins est donc indispensable mais sera bien évidemment restreinte aux candidats les plus prometteurs issus d'une sélection *in vitro*.

5351. Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer en termes de fréquence chez l'Homme. Avec environ 609 000 décès imputés par an, c'est également la troisième cause de décès par cancer. Les CCR sporadiques représentent 95% des cas. Aussi, on considère que 75 à 80% des causes de CCR sont liées à des facteurs environnementaux, alors que les facteurs génétiques familiaux représentent seulement environ 20% de la causalité.

Le microbiote intestinal, qui regroupe l'ensemble des microorganismes présents dans le tractus digestif est un élément essentiel de l'environnement colique, et les interactions entre microbiote et CCR font l'objet d'un intérêt croissant. Les *Escherichia coli* sont des bactéries du microbiote intestinal fortement suspectées d'être impliquées dans le développement du CCR. En effet, contrairement au tissu sain, plus d'une tumeur sur 2 sont colonisées par des *E. coli* porteur de l'îlot génomique *pks* (*E. coli pks*) responsable de la synthèse d'une toxine : la colibactine. Les *E. coli pks* induisent des cassures de l'ADN et augmentent le nombre de tumeurs dans un modèle murin de CCR. L'étude *in vitro* du devenir des cellules infectées par des *E. coli* producteurs de colibactine a révélé que certaines d'entre elles présentaient un phénotype atypique pouvant impacter le caractère agressif de la tumeur. Le but de notre étude est d'analyser *in vivo* dans un modèle de xénogreffe l'agressivité des cellules atypiques apparues suite à l'exposition à des *E. coli pks*.

Les animaux utilisés seront des souris femelles Nude âgées de 5 semaines. Nous implanterons (xénogreffe) des cellules ayant été infectées par des *E. coli pks* ou des *E. coli* dans lesquels l'îlot *pks* a été inactivé et suivrons le devenir des tumeurs. La taille des tumeurs sera mesurée régulièrement. A la fin de l'expérience, la totalité de la tumeur sera récoltée en vue d'analyses globales. En application du principe des 3R, l'utilisation des xénogreffes sera optimisée réalisant sur chaque tumeur des extractions de protéines, d'ADN, d'ARN et une partie sera réservée pour les études histologiques. Le nombre d'animaux par lots a été réduit à 10 par groupes expérimentaux. Un total de 240 animaux sera nécessaire pour mener à bien l'expérience.

Les animaux seront observés quotidiennement et le volume des tumeurs mesuré tous les 2 jours. La durée de l'expérience sera de 60 jours. Au moindre signe de stress/douleur, l'animal en question sera isolé et du paracétamol lui sera administré par gavage de manière à nous en assurer de la prise. Si une perte de poids supérieure ou égale à 10% du poids total de l'animal est observée, l'animal sera euthanasié. De même, les animaux seront sacrifiés si le diamètre des tumeurs excède la taille critique de 1,2 cm.

Afin prendre en compte le stress des animaux, ils seront hébergés 5 par cages de 900cm<sup>2</sup> et auront libre accès à l'eau et la nourriture. Les conditions d'hébergement respectent la réglementation. De plus l'enrichissement du milieu est prévu avec l'utilisation de maisonnettes en carton disposées à l'intérieur des cages.

5352. Le projet a pour objectifs d'identifier les mécanismes à l'origine de la différence de réponse des régimes induisant une forte chute de sécrétion des matières grasses (appelé 'Milk Fat Depressing') chez la vache et pas chez la chèvre et de préciser les spécificités du métabolisme des lipides dans la glande mammaire et le rumen chez ces 2 espèces.

Pour cela nous travaillerons avec 12 chèvres de race Alpines et 12 vaches laitières de race Holstein à un stade physiologique identique (c'est-à-dire après le pic de lactation). Les animaux seront mis en place pour une première période pré-expérimentale d'une durée de 15 jours correspondant à une période d'adaptation aux locaux et au régime témoin. Les vaches et les chèvres

laitières (4 lots de 3 vaches et 3 chèvres) seront conduites ensuite selon deux carrés latins 4 x 4 (un carré latin par espèce). Les animaux recevront 4 régimes expérimentaux sur 4 périodes de 4 semaines : un régime à base de foin de prairie naturelle et aliments concentrés (témoin), un régime complété par de l'huile de tournesol et amidon (HT), un régime complété par de l'huile de poisson (HP), un régime complété avec un savon de calcium d'huile de palme. Ces effectifs sont nécessaires et suffisants pour mettre en évidence des différences statistiquement valides (application du principe de réduction).

En plus de l'enregistrement des paramètres zootechniques, des mesures seront effectuées sur prélèvements de sang, sur prélèvements de lait, sur prélèvements de tissu mammaire par biopsie et sur prélèvements de liquide ruminal par sonde œsophagienne. Des enregistrements de paramètres de comportement alimentaire seront également réalisés grâce à des colliers Ethosys.

A la fin de chacune des périodes expérimentales, un animal par régime et par carré latin (4 vaches et 4 chèvres) sera conduit en enceinte respiratoire pour des mesures de bilans digestifs et émission de méthane pour une durée de 5 jours.

A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation sur animal vivant pour ce type d'essai (application du principe de remplacement). Il n'existe pas non plus de méthodes alternatives aux biopsies de glande mammaire pour l'étude in vivo du métabolisme lipidique dans la glande mammaire. Enfin le prélèvement de liquide de rumen avec une sonde œsophagienne présente une alternative à la pose de canule ruminale. Des mesures antalgiques seront mises en place en tant que de besoin (principe du raffinement dans les procédures expérimentales).

5353. Notre projet de recherche se focalise sur la mise au point de stratégies thérapeutiques innovantes applicables à des pathologies d'origine génétique pour lesquelles il n'existe aucun traitement. Nous nous intéressons plus particulièrement aux maladies neuromusculaires et neurodégénératives, dont la maladie de Huntington (HTT).

Nos stratégies se basent à la fois sur des approches de thérapie génique, c'est-à-dire le transfert de gènes thérapeutiques au sein de tissus altérés, et sur des stratégies antisens, utilisant des molécules oligonucléotidiques capables d'interférer avec la machinerie génétique des cellules pour diminuer l'expression de la protéine mutée qui est toxique. Nos approches permettent ainsi de réaliser une véritable « chirurgie du gène ». Plusieurs types de vecteurs de gènes (viraux et non viraux) sont évalués pour les approches de thérapie génique. De la même façon, plusieurs types d'oligonucléotides sont testés dans le cadre des stratégies antisens.

Nos outils sont d'abord évalués in vitro pour leur fonctionnalité avant les études in vivo qui sont indispensables (remplacement) afin de sélectionner les candidats les plus prometteurs et de remplacer autant que possible le screening in vivo (réduction). L'évaluation de l'efficacité thérapeutique de nos molécules d'intérêt n'est cependant pertinente qu'à travers des essais in vivo. La souche de souris YAC128 est utilisée pour investiguer sur HTT. Nous réaliserons principalement des injections stéréotaxiques, sur animaux toujours anesthésiés. Le bien-être animal est toujours pris en compte puisque les animaux reçoivent des injections sous-cutanées d'un anesthésique local avant la chirurgie, et d'un antalgique systémique pendant l'opération (raffinement).

Le nombre total d'animaux utilisés est justifié et s'élève à un maximum de 400 par an (sur 5 ans soient 2000 souris pour le projet), dont la moitié seulement sera porteuse du transgène et seront inclus dans les procédures expérimentales, qui ont toutes pour objectif de corriger le phénotype pathologique des animaux.

5354. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) et le lymphome sont deux maladies du sang. La LLC est la leucémie la plus commune dans le monde occidental, elle affecte principalement des patients âgés et elle est encore incurable sans la transplantation allogénique de cellules souches.

Les lymphomes représentent, quant à eux, le 6ème rang par ordre de fréquence des cancers survenant chez les hommes et les femmes ainsi que le 7ème en termes de cause de décès par cancer en France. On diagnostique en France 11000 nouveaux cas chaque année et près d'un patient sur deux atteint d'un lymphome décède de sa maladie.

Le développement de nouveaux traitements est donc nécessaire. Parmi ceux-ci, les peptides pénétrants sont des molécules qui peuvent entrer dans les cellules sans causer de dommages de la membrane, ce qui conduit à leur utilisation proposée à la fois comme vecteurs de délivrance des produits thérapeutiques mais également comme molécule thérapeutique de par leurs propriétés anti-tumorales. L'utilisation de ces peptides est devenue l'une des techniques les plus efficaces pour parvenir à l'accès intracellulaire et compte tenu de leur faible taille, il présente une faible toxicité et un faible effet immunogène. Plusieurs peptides pénétrants qui atteignent le cytoplasme et le noyau ont déjà été identifiés.

Parmi ceux-ci, cinq peptides ont été évalués in vitro sur des cellules tumorales de LLC et de lymphomes et ils ont démontré une activité anti-tumorale. L'objectif de ce projet d'étudier l'activité thérapeutique de ces cinq peptides, les modèles animaux utilisés seront un modèle de LLC xénotreffé chez la souris SCID et un modèle de lymphome humain xénotreffé chez la souris BALB/c Nude. Le nombre d'animaux utilisés sera de 132 souris réparties en 60 souris SCID et 72 souris BALB/c Nude; afin d'avoir tous les contrôles nécessaires pour valider les activités thérapeutiques de ces cinq peptides.

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, les molécules ont été évaluées in vitro dans un premier temps sur cellules fraîches de patients atteints de LLC et sur lignées cellulaires immortalisées (principe de remplacement) avant les études in vivo, le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux (principe de raffinement).

5355. Les entérobactéries sont de plus en plus résistantes aux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines est principalement due à des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les  $\beta$ -lactamases, les carbapénèmases sont

les plus puissants mécanismes de résistance aux carbapénèmes. Ces carbapénémases conduisent ainsi à une inefficacité partielle ou totale des antibiotiques de la classe des carbapénèmes (imipénème, méropénème, ertapénème et doripénème) considérés comme des traitements de dernier recours.

Les entérobactéries productrices de carbapénémases sont généralement multirésistantes à d'autres familles d'antibiotiques et peuvent ainsi induire des infections difficiles à traiter et être sources d'impasses thérapeutiques. Il est donc indispensable d'évaluer de nouveaux antibiotiques présentant de nouveaux mécanismes d'action.

Le but de notre projet est d'étudier l'efficacité d'un nouveau composé appartenant à une nouvelle classe et présentant donc un nouveau mécanisme d'action dans un modèle murin de septicémie et dans un modèle d'infection de cuisse chez la souris neutropénique.

Pour la première partie de l'étude, 636 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit une septicémie chez les souris, 5 groupes seront traités avec l'agent anti-infectieux (5 concentrations différentes), 5 groupes seront traités avec le méropénème (5 concentrations différentes) et 1 groupe ne recevra pas de traitement (animaux témoins). Les souris seront ensuite observées durant 7 jours.

Afin de mener à bien la deuxième partie de l'étude, 216 souris Swiss femelles vont être utilisées. Après avoir induit une infection de la cuisse chez des souris neutropéniques, 2 groupes seront traités avec l'agent anti-infectieux (1 groupe euthanasié à 24h et l'autre à 48h), 2 groupes seront traités avec l'antibiotique comparateur (méropénème, 1 groupe euthanasié à 24h et l'autre à 48h) et 3 groupes ne recevront pas de traitement (animaux témoins euthanasiés 1h, 24h ou 48h après infection). Après euthanasie, le quadriceps de la cuisse droite et celui de la cuisse gauche seront prélevés afin de déterminer les charges bactériennes.

Pour l'ensemble de ce projet, nous utiliserons un total de 852 souris.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

Réduction : les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite. Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

Raffinement :

- Avant l'expérimentation :

o Choix des souches et modèles : Les souches choisies correspondent aux souches retrouvées lors des infections de sepsis et de cuisse chez l'homme.

o Conditions d'hébergement réglementaires.

o Détermination des points limites : Lors de l'évaluation des signes généraux, si apparition de 3 signes cliniques notables (poils hérissés, dos bossu, perte de poids, isolement de certains individus par rapport au groupe, réaction de défense intensifiée, hypomobilité, respiration ralentie, paupières closes, diminution ou absence de prise de nourriture), la souris sera euthanasiée. Si apparition d'un signe clinique sévère (tremblements généralisés, convulsion, suffocation, perte de poids > 10%, absence de prise de nourriture sur plus de 2 jours, souris froide au toucher), la souris sera également euthanasiée.

- Pendant l'expérimentation :

o Soins pré et postopératoires : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,05mg/kg pour les modèles modérés ou 0,1mg/kg pour les modèles sévères) 30 minutes avant l'infection puis 2 fois par jour pendant 48h (soit la durée totale pour les modèles de DL100 et d'infection de cuisses). Pour le protocole de DE50, les animaux sont observés et pesés à J3 et en cas de constatation de symptômes de douleurs ou de perte de poids, le traitement sera prolongé. Si aucun des deux n'est observé, arrêt de la buprénorphine et de la pesée.

o Le modèle d'infection de cuisse est réalisé sous anesthésie générale : inhalation continue d'isoflurane 3% débit de gaz frais 0,8L/min.

o Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

o Euthanasie par dislocation cervicale après pré-anesthésie par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0,8L/min).

Le bien-être des animaux sera ainsi surveillé tout au long de l'étude.

5356. L'arthrose est la première cause de maladie articulaire. Elle affecte 10 millions de Français et induit douleur et raideur articulaires responsable secondairement d'un handicap parfois sévère. Ses principaux facteurs de risque sont le vieillissement, l'obésité et les traumatismes articulaires définissant des sous-groupes (ou phénotypes) distincts d'arthrose. Elle est liée à une inflammation articulaire conduisant à une dégradation du cartilage, tissu de glissement entre les os dans les articulations. Nos expériences ont montré que les cellules du cartilage, appelées chondrocytes, sont pourvues d'un récepteur nicotinique alpha-7 (ChRna7) appelé ainsi car il peut lier entre autres la nicotine. L'activation de ce récepteur sur les chondrocytes par des composés pharmacologiques déjà existants a un effet anti-inflammatoire et donc potentiellement protecteur dans l'arthrose. De plus, au-delà de son possible rôle local sur l'articulation, l'activation de ce récepteur chez les souris obèses les protégerait des effets délétères de l'inflammation généralisée liée au tissu gras au cours de l'obésité. En effet, cette inflammation associée à l'obésité est responsable en partie des complications comme le diabète, l'athérome mais aussi l'arthrose. Ce récepteur pourrait donc faire le lien entre arthrose et obésité, en plus des contraintes mécaniques de l'obésité sur les articulations des membres inférieurs (hanche, genou).

Notre objectif est de déterminer le rôle du récepteur ChRna7 dans la physiopathologie de l'arthrose. Notre hypothèse est que l'absence de ce récepteur nicotinique alpha-7 augmenterait les lésions arthrosiques, et ce particulièrement dans les phénotypes plutôt inflammatoires comme l'obésité. Ainsi, afin de mieux cibler l'implication de ce récepteur dans la physiopathologie de l'arthrose, nous souhaitons déterminer si son rôle est local ou systémique et dans quel phénotype il est particulièrement impliqué (obésité, vieillissement ou mécanique).

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 336 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

**Remplacement :** Notre équipe travaille sur des modèles cellulaires mais nous ne pouvons toutefois pas nous affranchir d'un modèle animal dans le cadre de certains aspects de nos projets. En effet, un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de ce projet. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu.

**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, les procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Des mesures antalgiques seront mises en place en tant que de besoin (principe du raffinement dans les procédures expérimentales). 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.

5357. Ce projet a pour but d'analyser les effets de différents types d'anticorps dirigées contre le peptide  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) sur un modèle animal d'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC), particulièrement les complications hémorragiques et inflammatoires.

L'AAC est une maladie neurovasculaire fréquente chez le sujet âgé, et presque constante chez le sujet atteint de maladie d'Alzheimer. Elle est caractérisée par des dépôts de peptide  $A\beta$  dans la paroi des vaisseaux cérébraux et leptoméningés. Le plus souvent asymptomatique, l'AAC peut cependant se compliquer d'inflammation des vaisseaux cérébraux (AAC inflammatoire ou AAC-i), ou d'accidents vasculaires cérébraux majeurs (AAC hémorragique ou AAC-h). Ces complications sont la cause de plusieurs milliers d'hospitalisations et de décès chaque année en France. Chez l'homme et dans les modèles murins d'AAC, on sait que l'administration d'anticorps monoclonaux anti- $A\beta$  peut provoquer l'apparition de ces complications.

Ce projet expérimental vise à identifier les types d'anticorps anti- $A\beta$  (classes d'immunoglobulines et affinités) responsables d'AAC-i et d'AAC-h, et à élucider les mécanismes en jeu dans ces pathologies.

**Type d'animaux :** souris sauvage C57BL/6J et transgénique APP23 sur fond C57BL/6Npa.

**Nombre d'animaux :** Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 180 souris pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux prévu 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 :** Aucune possibilité d'utilisation d'une méthode alternative, car ce projet met en jeu différents systèmes organiques et acteurs complexes : la production d'anticorps polyclonaux murins, de spécificité, affinité et isotypie variables ; la survenue attendue de lésions des vaisseaux cérébraux spécifiques de l'AAC dans le modèle murin transgénique APP23 ; l'induction de lésions cérébrales hémorragiques, ischémiques et/ou inflammatoires chez les animaux transgéniques traités par anticorps polyclonaux. Il n'est pas possible de reproduire ces événements complexes hors d'un système vivant.

**Réduction :** Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir : i) les quantités requises d'anticorps polyclonaux de chaque classe après immunisation; ii) des résultats fiables après administration de ces fractions d'anticorps aux souris receveuses. Les variabilités inter-individuelles et inter-groupes sont déjà minimalisées par l'utilisation d'animaux sur fond syngénique, un nombre plus faible exposerait à de trop grands risques de résultats non valides.

**Raffinement :** Dans la réalisation de ce projet, toutes les procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect au maximum du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Des mesures antalgiques seront mises en place en tant que de besoin (principe du raffinement dans les procédures expérimentales).

5358. La maladie d'Alzheimer est la plus courante des démences neurodégénératives. De par le vieillissement de la population et l'absence de traitements, elle est devenue une priorité de santé publique. La pathologie est liée à la présence de lésions cérébrales notamment dues à l'accumulation de peptides  $A\beta$  (plaques séniles extracellulaires) et de protéines tau hyperphosphorylées (agrégats de neurofibrilles intracellulaires). Ces accumulations anormales sont responsables d'une neuro-inflammation et de la mort neuronale à l'origine des déficits cognitifs et de la démence.

Parmi les mécanismes cellulaires impliqués dans cette pathologie, la voie JNK représente une cible d'intérêt pour la mise en place de stratégie thérapeutique. Le but de ce projet d'étude est de déterminer la concentration optimale d'un inhibiteur de JNK comme outil thérapeutique dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris transgénique « 5XFAD »).

Ce projet d'étude se situe dans la continuité d'une étude précédente qui avait mis en évidence les bénéfices de l'inhibition de JNK chez la souris 5XFAD :

- Réduction des déficits cognitifs,

- Réduction de la charge amyloïde
- Réduction de la mort neuronale et de la neuro-inflammation.

De nombreux modèles murins transgéniques reproduisant les aspects cellulaires, moléculaires et cognitifs de la maladie d'Alzheimer ont été créés. Parmi ceux-ci, la souris transgénique 5XFAD est couramment utilisée. Ces animaux transgéniques ne souffrent pas physiquement de la pathologie qu'ils modélisent. Cependant, ils présentent des déficits cognitifs ainsi qu'une période de reproduction et une durée de vie réduite, d'où la classification en phénotype dommageable. Ils représentent donc le modèle le plus adapté aux besoins de ce projet d'étude. Nous souhaitons utiliser des souris 5XFAD et des souris « littermate » (souris sauvages contrôles de nos souris transgéniques).

D'après la littérature, l'inhibition de JNK n'entraîne pas l'apparition de phénotype dommageable chez les souris, sauvages ou d'autres génotypes. Au contraire, les injections de notre inhibiteur de JNK ont pour but de réduire l'évolution de la pathologie.

Ce projet d'étude a été pensé en accord avec la règle des 3R :

1) **REPLACER** : Nous demandons l'autorisation pour ce projet d'expérimentation animale utilisant la souris comme modèle d'étude car aujourd'hui, aucune approche in vitro ne permet de rendre compte de façon fiable des interactions présentes au sein d'un tissu tel que le cerveau et des échanges entre cellules, tissus et organes. La maladie d'Alzheimer est une pathologie complexe qui ne peut être modélisée par des modèles in vitro, d'autant que nous recherchons un effet sur les déficits cognitifs qui ne peut être mesuré que chez les rongeurs.

2) **REDUIRE**: Nous avons tenu compte du principe de réduction d'effectif. Au total, 100 animaux seront impliqués dans ce projet d'étude, 50 souris 5XFAD et 50 souris « littermate ». Pour chaque génotype, les souris seront réparties en 5 groupes de 10 animaux (1 groupe contrôle non traité et 1 groupe par dose d'inhibiteur de JNK). Ce nombre d'animaux par groupe est le minimum requis pour réaliser des analyses statistiques scientifiquement rigoureuses des résultats des tests comportementaux et des analyses biologiques.

3) **RAFFINER** : Nous avons pris en compte le bien être de l'animal qui est surveillé tout long des différentes étapes de ce projet. Seul quatre doses ont été choisies pour être testées, les injections se faisant à un intervalle de récupération suffisant (21 jours). L'apparition de signe de stress ou d'une diminution du bien-être de l'animal est mesurée au moyen d'une échelle mise en place pour ce projet d'étude. Le choix des tests comportementaux a été réalisé en prenant en compte le possible stress qu'ils pouvaient induire. Cette demande d'autorisation de projet d'étude recouvre :

- l'élevage et le traitement des animaux au sein d'une zone Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques
- les analyses comportementales

- les analyses biologiques (histologiques, biochimiques et moléculaires) nécessitant l'euthanasie des animaux après les tests comportementaux (prélèvement du cerveau).

En conclusion, l'objectif du projet est de déterminer la dose optimale d'inhibiteur de JNK ralentissant le développement de la pathologie et/ou modulant les processus neuropathologie conduisant à l'apparition de lésions cérébrales chez les souris 5XFAD.

5359. La néo-vascularisation rétinienne correspond à la prolifération de vaisseaux au niveau de la rétine sensorielle en provenance de la choroïde (couche richement vascularisée entre la rétine et la sclère) après destruction normalement progressive, de la couche cellulaire qui sépare ces deux entités : l'épithélium pigmentaire. Cet envahissement est à l'origine d'une baisse de l'acuité visuelle en vision de près, mais aussi de loin à cause de l'apparition d'une tache centrale appelée scotome central. Il y a 10 ans il n'existait pas de traitement et l'évolution se faisait progressivement vers l'aggravation de la baisse visuelle et du scotome centrale, lié à la destruction progressive des cellules qui recueille la lumière sur la rétine appelées les photorécepteurs. Chez l'homme nous connaissons différentes pathologies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, les néo-vaisseaux des forts myopes et d'autres entités cliniques plus rares qui utilisent la fragilité rétinienne acquise pour se développer. Notre travail consiste à induire des lésions rétinienne sur des souris par laser ophtalmologique argon, afin d'induire un remaniement local avec destruction de l'épithélium pigmentaire et inflammation à l'origine de néo-vaisseaux (accumulation de cellules microgliales, phagocytose des photorécepteurs, production de VEGF). Après maturation de ces néo-vaisseaux nous testerons une molécule, qui a prouvé son efficacité sur la néo-vascularisation tumorale, afin d'évaluer son action au niveau rétinien par voie générale après gavage de 5 jours.

Objectif : maîtriser le protocole de laser sur une rétine de souris et évaluer l'effet du PST3.1a sur les néo-vaisseaux rétinien.

Nous appliquons la règle des 3 R:

1. **REPLACER** : Nous ne pouvons pas remplacer ce modèle par un modèle in vitro car il n'existe pas pour la rétine.

2. **REDUIRE** : Nous réduisons au minimum le nombre d'animaux pour obtenir des résultats exploitables au niveau statistique. Le nombre d'animaux par groupe est de 10. Pour l'ensemble du projet 20 souris c57bl6 seront nécessaires.

3. **RAFFINER** : Nous raffinons nos conditions d'expérimentation et d'hébergement pour le bien-être de nos animaux. Les animaux sont hébergés dans des cages aux normes (au minimum par 2 et au maximum par 4) suivant l'âge et le poids des animaux de plus les cages sont enrichies par des jouets (rouleau sopalin, copeaux). Les animaux sont surveillés au quotidien par le personnel de l'animalerie et le poids est suivi 2 fois par semaine. Des mesures antalgiques seront mises en place en tant que de besoin (principe du raffinement dans les procédures expérimentales).

Les retombés du projet : tester une molécule anti-angiogénique récemment découverte, et évaluer son intérêt ophtalmologique.

5360. Les connections entre neurones, les synapses, peuvent être remaniées à l'échelle microscopique, lors de phénomènes d'apprentissage ou de plasticité dans le cerveau. Aussi, nos expériences peuvent modifier la structure et la connectivité des neurones à plus grande échelle: récemment, des études histologiques ou réalisées chez l'animal éveillé ont montré que même chez

l'adulte, les branches elles-mêmes des axones peuvent être dynamiques. Ceci implique que des changements de grande échelle de la connectivité entre neurones sont aussi possibles dans le cerveau adulte.

L'objectif de notre projet est de caractériser, à l'échelle du cerveau entier, les bases structurales et moléculaires de la plasticité neuronale à long terme et à grande échelle. Notre hypothèse de travail est que des modifications de la structure de quelques neurones à longues projections peut suffire pour moduler un comportement.

Pour répondre cette question nous avons choisi de nous intéresser au comportement de construction du nid chez la souris, et des modifications qualitatives dans ce comportement qui accompagnent la gestation chez les femelles. Nous caractériserons en utilisant des techniques histologiques de pointe de microscopie en feuillet à lumière les modifications des réseaux neuronaux qui accompagnent les changements de performance dans la création du nid au cours de la gestation. Nous avons choisi ce modèle pour trois raisons : il est facilement accessible et analysable. C'est un comportement plastique qui évolue avec l'expérience de l'animal. C'est un modèle relativement peu étudié dans ce contexte.

A notre connaissance après une recherche dans plusieurs bases de données de la littérature scientifique, il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de modèles animaux pour étudier la plasticité neuronale à grande échelle chez l'adulte. En conséquence, nous prévoyons l'emploi d'un modèle murin simple que nous maîtrisons parfaitement au laboratoire. Un total de 32 souris seront nécessaires pour ce projet.

La règle des 3 R a été considérée pour la mise en place du projet :

-Remplacement. Les animaux ne peuvent pas être remplacés dans ce type d'expériences. L'étude de la plasticité à ce type d'échelle se fait sur cerveaux entiers.

-Réduction du nombre d'animaux suffisants pour permettre des données statistiquement fiables.

-Raffinement le stress/fatigue/douleur de l'animal est réduit à son maximum par une surveillance quotidienne, et le minimum d'ingérence de la part de l'expérimentateur. Enfin, nous avons introduit des points limites à notre protocole.

5361. Les travaux menés entre notre laboratoire et un autre laboratoire en collaboration ces dix dernières années ont permis de mettre au point une nouvelle technique de thérapie du cerveau par ultrasons complètement non invasive. En focalisant les ondes ultrasonores dans le cerveau à travers la boîte crânienne par la technique du retournement temporel, il est possible de concentrer de manière très précise les ultrasons dans une petite zone millimétrique. La précision et l'efficacité du système ainsi que la possibilité de suivre en temps-réel la thérapie par IRM ont été précédemment démontrées sur des tissus ex vivo (tissus animaux et cadavres humains), ainsi que in vivo sur des modèles de rongeurs en utilisant un système adapté au petit animal.

La focalisation des ondes ultrasonores permet d'obtenir des effets thérapeutiques en fonction du niveau de puissances utilisé: à très haute intensité c'est l'ablation de la zone focale qui est réalisée par effet thermique en quelques dizaines de secondes, tandis qu'à très faible intensité et en combinant l'injection de microbulles (agents de contrastes échographiques standards) c'est l'ouverture réversible de la barrière hémato-encéphalique qui est réalisée dans la zone focale. L'objectif de ce projet est de valider cette approche d'ouverture réversible de la barrière, de neuromodulation et de tester l'action de molécules sur le cerveau n'ayant dans des conditions ordinaires pas de mode d'action possible sur le cerveau (car ne passant pas la barrière hémato-encéphalique).

Au cours de ce projet un maximum de 4 macaques sera utilisé. Les animaux en fin de protocole seront placés dans un zoo ou centre de retraite (si l'avis vétérinaire le valide et si aucune donnée expérimentale n'est nécessaire pour une acquisition post-mortem).

Remplacement: Avant d'effectuer ce projet mais également dans des projets parallèles à ces mesures in vivo, des acquisitions par simulation mathématiques seront effectuées et enrichies par les enregistrements de ce projet.

Réduction: Un calcul systématique de puissance statistique sera effectué pour limiter au maximum le nombre d'animaux par procédures.

Raffinement: Plusieurs procédures seront effectuées afin de réduire au maximum le stress des animaux et ceci par un entraînement quotidien à la coopération (entrée et sortie de cage). Par ailleurs l'utilisation de nouveaux matériels d'implantation limitant le risque d'infection et la biocompatibilité seront choisis.

5362. Les composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle central dans la biologie du tissu osseux, et en particulier les protéines de la famille des SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins). Des souris présentant une extinction génique (simple ou double KO) de deux SIBLING majeures, l'ostéopontine (OPN) et la sialoprotéine osseuse (BSP), ont été générées dans le but d'évaluer l'effet de leur absence sur le squelette, et en particulier la réponse aux contraintes mécaniques, qui sont connues pour stimuler l'expression des SIBLING dans l'os.

Notre objectif est de découvrir comment l'absence de l'OPN, de la BSP ou des deux protéines (dont certaines fonctions sont complémentaires) va altérer la réponse du squelette des souris à une contrainte mécanique chronique.

Nous testerons donc les effets d'un doublement du poids corporel, qui exercera une contrainte majeure sur leur squelette, sur des souris mâles sauvages et mutantes (3 lignées mutantes), âgées de 2 et 4 mois et sur les cellules du sang.

Ce travail ne peut être réalisé que sur des organismes complets et génétiquement modifiés pour les gènes d'intérêt, donc sur des souris.

Les animaux seront soumis pendant 45 jours à une hypergravité de 2G dans une centrifugeuse dédiée, et comparés à des contrôles conservés à 1G.

A la fin de l'expérience, le sérum sera prélevé sur toutes les souris, et leurs os seront analysés en micro-tomographie, histomorphométrie, biochimie, QRT-PCR et biomécanique.

Il est attendu que les réponses de souris n'exprimant pas l'une de ces protéines ou encore aucune des deux voient leur réponse à l'hyper-gravité altérée, ce qui permettra de comprendre le rôle de chacune de ces SIBLING, ainsi que les interactions existant entre elles, dans la réponse aux contraintes mécaniques.

Le projet utilisera un total de 600 souris.

Chaque animal bénéficiera d'une attention et de soins de qualité incluant des mesures antalgiques, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 4), dans un environnement enrichi (copeaux, bâtonnets à ronger).

Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

5363. Le syndrome de Sjögren est la maladie auto-immune systémique la plus fréquente après la polyarthrite rhumatoïde, puisqu'elle concerne de 0,1% à 0,4% de la population adulte, c'est à dire 50 000 à 200 000 malades en France avec une large prédominance féminine (9 femmes pour 1 homme). Les manifestations de la maladie sont nombreuses, avec classiquement une sécheresse buccale et oculaire, une fatigue permanente, des douleurs articulaires invalidantes mais aussi des atteintes pouvant engager le pronostic vital, touchant les neurones, les reins, les poumons mais aussi un risque accru de lymphome, principale complication de la maladie, environ quarante fois supérieur à celui de la population générale.

En dehors de certaines atteintes bien codifiées, les traitements actuellement à disposition sont maigres, et l'altération majeure de la qualité de vie est bien réelle chez ces patients, malgré l'utilisation de mesures de substitution (par exemple les substituts salivaires et les larmes artificielles) bien trop souvent mises en échec.

Il existe, depuis une dizaine d'années maintenant, de nombreuses publications scientifiques rapportant des indices en faveur de l'existence, dans le syndrome de Sjögren, d'une activation anormalement importante d'une voie de signalisation majeure de l'organisme appelée « voie de l'interféron de type 1 ».

Une société avec qui nous collaborons, développe actuellement un vaccin thérapeutique ciblant l'interféron alpha (IFN alpha), principal représentant de la famille des interférons de type 1, dans une autre maladie auto-immune systémique, le lupus érythémateux systémique (LES) avec des résultats encourageant chez la souris et chez l'Homme. Ce vaccin est constitué d'IFN alpha, ainsi que d'une protéine porteuse, l'hémocyanine de patelle (KLH), ce qui lui permet d'induire la fabrication d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IFN alpha.

Compte tenu de ces données et du besoin majeur de traitement, l'objectif de notre étude est de démontrer l'intérêt que représente une stratégie de vaccination thérapeutique anti-IFN alpha, appliquée à un modèle murin de syndrome de Sjögren à développement lent et à haut risque de lymphome, le modèle de souris transgénique pour l'IL14alpha (IL14alphaTg). Aucune méthode *in vitro* n'est utilisable pour ce projet. Le vaccin choisi, appelé IFN-Kinoïde, a déjà été utilisé dans plusieurs études précliniques, notamment par notre équipe en utilisant un autre modèle murin de syndrome de Sjögren, le modèle MRL/lpr. Au travers de cette étude, nous avons démontré que le vaccin avait une bonne immunogénicité (fabrication d'anticorps neutralisants ciblant l'IFN alpha en réaction à la vaccination), induisait une amélioration des manifestations liées à la maladie (amélioration de la sécheresse oculaire, de la sécheresse buccale et de l'atteinte neurologique) et était parfaitement toléré (aucun effet indésirable notable).

Ici, nous utiliserons 16 souris contrôles non génétiquement modifiées et 131 souris IL14alphaTg, qui développent spontanément dès 6 mois, les atteintes salivaires et lacrymales typiques de la maladie, ainsi qu'un certain degré d'auto-immunité. En vieillissant, ces souris ont par ailleurs un risque accru de survenue de lymphome B (environ 100% des souris après 18 mois), ce qui représente la principale complication chez les patients atteints de cette maladie. Les souris seront réparties en groupes égaux de 15 individus, qui se différencieront par la molécule et la voie d'administration choisies : soit le traitement (IFN-Kinoïde par voie intramusculaire, IFN-Kinoïde par voie conjonctivale ou IFN-Kinoïde par voie sublinguale) soit un contrôle (KLH ou tampon phosphate salin [PBS]). Ainsi, il sera possible de déterminer si l'IFN-Kinoïde a un effet bénéfique sur les caractéristiques de la maladie et si la voie d'administration a un impact sur cet effet.

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

5364. Une fonte musculaire sévère est associée à de nombreuses pathologies chroniques comme le cancer, le SIDA, l'insuffisance cardiaque. Cette perte de masse musculaire est très délétère pour le patient, affectant sa qualité de vie mais aussi réduisant la réponse aux traitements et la survie. La compréhension de cette atrophie musculaire et le développement de traitements efficaces représentent un réel enjeu clinique. Des molécules de l'inflammation, appelées cytokines, produites notamment par les cellules immunitaires, les tumeurs ou le muscle lui-même, induisent un programme cellulaire conduisant à une fonte du muscle (diminution de la synthèse des protéines musculaires et une augmentation de leur dégradation) et une perte de force musculaire.

Nous souhaitons développer un nouveau modèle de souris génétiquement modifiées exprimant dans le muscle squelettique un gène modifié impliqué dans la régulation de la masse musculaire. Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués la fonte musculaire induite par la cachexie et d'identifier de nouvelles cibles moléculaires intéressantes pour le développement de nouveaux traitements.

Remplacement: Des expériences dans les cellules seront réalisées quand cela sera possible mais le modèle murin est essentiel pour étudier fonctionnellement le muscle et également étudier l'impact des défauts musculaires sur le reste de l'organisme.

Réduction: Nous utiliserons 320 souris, c'est à dire le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Raffinement: Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien avec mise en place de mesures antalgiques. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée.

### 5365. 1. Objectif scientifique du projet

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée présent dans la plupart des cellules immunitaires et épithéliales et qui entraîne une inflammation impliquée dans la réponse anti-virale. Mais, dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, cancer du poumon, etc.), l'activation du récepteur entraîne à la fois une inflammation mais aussi l'induction de la mort de ces cellules cancéreuses, faisant de TLR3 une cible thérapeutique prometteuse dans de nombreux cancers, basée sur ce différentiel de comportement entre des cellules normales et cancéreuses.

Au cours d'expériences antérieures, nous avons établi que la combinaison de paclitaxel avec un ligand de TLR3 avait une efficacité synergique contre la croissance d'une xéno greffe de cellules cancéreuses humaines du poumon. Cette synergie s'expliquait au moins en partie par la suppression de l'expression de cFlip par le paclitaxel. Au cours de ces expériences, il avait aussi été noté que l'état général des souris recevant la combinaison thérapeutique était significativement meilleur que celui des souris traitées par paclitaxel seul. Nos travaux récents ont établis que les cellules cancéreuses deviennent hypersensibles à un ligand de TLR3 lorsqu'elles entrent en sénescence. Nous voulons donc savoir si un ligand de TLR3 peut protéger des souris de la toxicité du paclitaxel et étudier son effet sur l'élimination des cellules sénescents normales et/ou cancéreuses induites par la chimiothérapie.

### 2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

La protection contre la toxicité du paclitaxel par un ligand de TLR3 représenterait un progrès médical significatif qui renforcerait l'intérêt de la combinaison thérapeutique. Elle constituerait la base d'une étude plus détaillée des mécanismes, en particulier vis-à-vis de l'élimination possible des cellules normales et/ou cancéreuses induites en sénescence par le paclitaxel. Si l'effet protecteur d'un ligand de TLR3 est confirmé, les combinaisons avec d'autres agents de chimiothérapie et avec la radiothérapie seront analysées.

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

- Le projet fait suite à des études en culture ayant démontré l'hypersensibilité au ligand de TLR3 des cellules tumorales bronchiques rendue sénescence par le paclitaxel, par un stress oxydatif ou des radiations ionisantes.
- Seul un modèle in vivo nous permettra d'étudier les effets de la combinaison sur l'état général des souris après traitement avec le paclitaxel seul ou combiné à un ligand de TLR3.
- A ce stade de nos recherches, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats: évolution du poids, état général (pelage, activités,...).
- Une surveillance adaptée des animaux permet de classer les procédures expérimentales en classe de gravité modérée. Des mesures antalgiques seront mises en place le cas échéant.

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

Au total, 2 expériences comportant 2 groupes de 5 souris (un total d'environ 10 souris) sont envisagées au cours de l'année à venir.

5366. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) est responsable d'une maladie grave caractérisée par un syndrome fébrile à manifestations hémorragiques sévères pouvant causer la mort dans 30 à 40% des cas. Principalement présent en Europe de l'Est et en Turquie, ce virus constitue une menace sérieuse pour l'ensemble des pays Européens. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace pour lutter contre cette infection. Un groupe de surveillance épidémiologique européen considère le développement d'un vaccin ou d'une approche thérapeutique contre le virus CCHF comme étant d'une importance majeure.

C'est dans ce contexte que nous souhaitons étudier in vivo, dans un premier temps, chez le modèle murin, l'efficacité de neutralisation d'anticorps, purifiés sous forme de fragments F(ab')<sub>2</sub>, spécifiques du virus CCHF. Lors d'une première procédure, il a été observé que 4 injections administrées en post-exposition au virus protègent à 62.5% le modèle murin dans un contexte de challenge léthal.

Ce projet a pour but de déterminer la dose optimale d'anticorps tout en affinant le planning d'administration par rapport à la procédure déjà effectuée.

Ce projet consiste en une procédure expérimentale, nécessitant un minimum d'effectif de 88 animaux. Le nombre total d'animaux inclus dans ce projet est donc de 88 souris IFNAR<sup>-/-</sup>.

Afin de raffiner les expérimentations, les animaux sont visités au moins une fois par jour par des personnels qualifiés et expérimentés. Les premiers signes cliniques liés à la pathologie étudiée pourront ainsi être observés et enregistrés grâce à un tableau de scoring permettant de fixer et standardiser le point limite. Ce scoring prend en compte, la perte de poids, l'amaigrissement visible, la dégradation du poil, la perte d'activité, et les signes de douleurs (démarche, faciès, comportement réponse aux stimuli). Une attention particulière sera portée sur l'enrichissement de confort (nids coton), sur l'enrichissement de stimulation (abri en carton) et sur l'enrichissement alimentaire (gélatine au fruit mélangée la litière). Pour des raisons de sécurité et de bien-être des animaux, tous les gestes (inoculation, prélèvements) seront réalisés sous anesthésie générale.

5367. Malgré de nombreux progrès thérapeutiques, le nombre de patients souffrant d'insuffisance cardiaque continue de progresser de façon dramatique, soulignant l'importance de l'étude des mécanismes impliqués dans cette pathologie. Il a été montré que l'aldostérone (Aldo), via l'activation du récepteur minéralocorticoïde (RM), joue un rôle majeur dans le remodelage cardiovasculaire (CV) en participant à l'hypertension, à la fibrose et à l'inflammation. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent ce rôle sont encore mal connus. L'objectif de notre étude est donc de comprendre in vivo les mécanismes impliqués dans les effets délétères de l'activation du RM, et en particulier dans le système CV. Une nouvelle cible du RM a été identifiée par le laboratoire, la Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) et nous avons montré qu'elle jouait un rôle majeur dans les effets physiopathologiques de l'aldo dans le modèle expérimental associant infusion d'aldostérone, administration de sel et uninephrectomie (challenge NAS) qui est utilisé depuis plus de 20 ans pour induire une hypertension artérielle dépendante des minéralocorticoïdes. Les souris présentant une invalidation génique pour NGAL (KO NGAL) sont protégées contre l'hypertension induite par l'aldostérone, ce qui suggère un rôle de NGAL dans la régulation de la réabsorption rénale de sodium et de potassium, grand modulateur de la pression artérielle. De plus, NGAL est retrouvé dans plusieurs contextes inflammatoires souvent associés aux mécanismes de remodelage cardiaque et rénal ainsi que dans la mise en place de l'hypertension artérielle.

(1) Nous voulons donc étudier d'une part le rôle de NGAL dans les mécanismes inflammatoires induits par l'aldo en réalisant une expérience de greffe de moelle osseuse provenant de souris KO NGAL chez des souris WT irradiées afin d'obtenir un modèle de souris chimères présentant une invalidation génique de NGAL dans les cellules immunitaires. Ces souris seront ensuite soumises au challenge NAS afin d'évaluer l'implication du NGAL inflammatoire dans les effets de l'aldo.

(2) D'autre part, nous voulons étudier le rôle de NGAL dans la régulation du transport rénal de sodium et de potassium grâce à l'utilisation de souris KO NGAL soumises à des régimes riches ou pauvres en sodium et en potassium.

(3) Finalement, nous voulons évaluer l'interaction entre ces deux mécanismes grâce à l'étude du rôle de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans la régulation rénale de sodium et de potassium. Pour ce faire, nous combinerons le protocole de transplantation de moelle osseuse décrite en (1) avec les régimes riches et pauvres en sodium et potassium décrits en (2).

Nous avons estimé, sur la base de notre expérience avec ces modèles animaux, que pour obtenir des résultats statistiquement différents, environ 14 souris par groupe sont nécessaires. Pour chaque expérience nous utilisons 4 groupes différents : un groupe de souris contrôle non traitées, un groupe de souris contrôle traitées, un groupe de souris génétiquement modifiées non traitées et enfin un groupe de souris génétiquement modifiées traitées.

Compte tenu des différentes expériences que nous allons mettre en place, un total de 892 souris sera utilisé afin de finaliser ce projet qui durera 5 ans dans les meilleures conditions.

Dans les procédures (1) et (3), les animaux irradiés et greffés sont des animaux commerciaux WT (C57Bl6). Les animaux donneurs de moelle sont quant à eux des animaux transgéniques issus de notre lignée KO NGAL.

Dans la procédure (2), les animaux utilisés sont des animaux transgéniques de notre lignée KO NGAL.

Mise en œuvre pratique des 3R :

- Remplacement

Nos modèles animaux sont utilisés pour étudier des mécanismes physiologiques visibles uniquement à l'échelle de l'animal. Toutes les études plus spécifiques sur des mécanismes plus délimités seront effectuées avec des cultures cellulaires.

- Réduction

Sous certaines conditions, nous pourrions utiliser les résultats des groupes contrôles obtenus au cours d'études précédentes, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Cette substitution ne sera possible que si, par exemple, l'âge des animaux est le même et si les conditions d'hébergement des animaux sont les mêmes.

De plus, nos modèles de souris intéressent plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes. Donc les organes sur lesquels nous ne travaillons pas pourront être récoltés par d'autres équipes afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement

Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude.

Les points limites ont été définis selon Morton et Griffiths (1985). Au cours de l'expérience, des mesures physiologiques sont effectuées régulièrement. L'animal est sacrifié en cas d'une chute significative de son poids de plus de 20% par rapport à son poids initial (de façon brutale ou progressive) au cours de la durée de l'expérimentation (mesures prises le lendemain de l'intervention, par la suite une fois par semaine jusqu'à la fin du protocole).

5368. Qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique (ASH) ou non alcoolique (NASH), la fibrose hépatique est la conséquence de mécanismes de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires chroniques et non résolues. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. Dans les pays développés, il est estimé que 45% de la mortalité pouvait être associée à des pathologies ayant une composante fibrotique.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement spécifique de la fibrose hépatique.

L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la fibrose hépatique biliaire, et ainsi de pouvoir proposer à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies fibrotiques dont la prise en charge représente des enjeux majeurs de santé publique.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique d'origine biliaire sera réalisée au cours de la durée couverte par ce projet (5 ans) avec 2300 souris et 2300 rats.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système physiologique complexe et intégré. La fibrose hépatique est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux.

Par ailleurs, les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait mis à mort par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

5369. La fibrose hépatique est la conséquence de mécanismes, de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires, chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire, auto-immune ou consécutive à une stéatohépatite (accumulation de graisse dans le foie) alcoolique ou non alcoolique (NASH). La fibrose est associée à une évolution pathologique grave puisqu'au stade tardif de la maladie, une cirrhose hépatique et ses complications potentielles, insuffisance hépatique et hépato-carcinome (HCC) peuvent survenir.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement spécifique de la fibrose hépatique. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de la fibrose hépatique mais également ses complications, cirrhose et hépato-carcinome. A terme, de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies fibrotiques, dont la prise en charge représente des enjeux majeurs de santé publique, pourront être proposées.

De nombreux modèles utilisant des rongeurs ont été décrits dans la littérature pour l'étude de ces pathologies. Aucun ne reproduit parfaitement la physiopathologie humaine de la NASH et ses complications. Aussi, nous avons développé un modèle innovant que nous souhaitons caractériser sur le développement de la fibrose et son évolution vers l'hépatocarcinome, et à terme évaluer les capacités thérapeutiques de nos molécules.

L'évaluation de l'efficacité de nos produits sera réalisée dans un modèle de rongeurs chez qui ce trouble est induit par un régime, les variantes des procédures expérimentales proposées permettront de mieux cerner les propriétés préventives ou protectrices des produits ou encore de mettre en avant une activité dite curative.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours des 5 années couvertes par ce projet avec 3680 souris et 3680 rats.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système physiologique complexe et intégré. La fibrose hépatique est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt.

De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

Bien que l'hépatocarcinome est le plus souvent découvert fortuitement chez l'homme car asymptomatique dans ses premières phases de développement, une prise en charge de la douleur sera mise en place dans notre modèle le cas échéant.

5370. Les maladies chroniques du foie sont fréquentes et potentiellement mortelles pour l'Homme

La plus connue : la cirrhose hépatique peut avoir des formes et origines variées et n'est pas nécessairement due à la consommation excessive d'alcool, son origine métabolique peut produire des lésions progressives suivies de régénérations du foie qui entraînent une fibrose pouvant conduire au stade cirrhotique.

Un des événements déclenchant est appelé « cholestase », il s'agit de l'arrêt ou de la diminution de la sécrétion de bile dans l'intestin.

Elle peut survenir du fait d'une obstruction de la voie biliaire principale qui traverse le foie.

Les conséquences de la maladie sont liées à la toxicité des acides biliaires qui s'accumulent dans le foie et dans l'organisme mais aussi à leur absence dans le tube digestif.

L'ictère (= jaunisse) en est la manifestation la plus courante.

L'ictère est une coloration jaune de la peau et des muqueuses, due à l'accumulation, dans le sang, d'un pigment dérivé de l'hémoglobine.

La maladie est évolutive, les conséquences d'une cholestase chronique sont multiples et peuvent entraîner des signes d'insuffisance hépatique majeurs allant jusqu'à la cirrhose, source de morbidité et de mortalité élevées.

On peut chez le rat reproduire chirurgicalement par une ligature (BDL: Bile duct ligation: ligature des canaux biliaires) pendant plusieurs semaines le phénomène d'obturation des voies biliaires. La fibrose hépatique qui est une perte de la fonctionnalité hépatique est présente dans ce processus évolutif expérimental. L'obstruction mécanique des canaux biliaires qui entraîne des modifications morphologiques du tissu hépatique est comparable à celles observées dans la pathologie humaine.

Notre projet concerne l'évaluation des propriétés thérapeutiques des composés pharmaceutiques dans le traitement des hépatopathies chroniques et de leur évolution vers la fibrose, nous envisageons d'utiliser 1620 rats au cours de la durée couverte par ce projet.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R.

L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal entier permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système physiologique complexe et intégré. Les fibroses sont des pathologies qui nécessitent un traitement chronique de longue durée (plusieurs semaines), ce type de protocole est difficile à réaliser autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal.

Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

La partie chirurgicale de l'étude est effectuée par Charles River Laboratories France agréé pour ce type d'opération.

La prise de la douleur en post-opératoire est effectuée par les laboratoires Charles River par le biais d'administration d'un analgésique de type morphinique (buprénorphine).

5371. L'ischémie-reperfusion rénale (définie par un arrêt puis une reprise de la circulation du sang dans les reins) est rencontrée dans diverses situations en pathologie humaine, comme les états de choc hémodynamique (chute prolongée de la tension artérielle), et au cours de la conservation des greffons destinés à la transplantation rénale (entre le moment du prélèvement du greffon chez le donneur et sa transplantation chez le receveur). Des données expérimentales chez l'animal et des données cliniques chez l'homme suggèrent un effet bénéfique des bloqueurs du récepteur minéralocorticoïde (RM) au cours de l'ischémie-reperfusion dans plusieurs organes, notamment le rein. Le mécanisme de cet effet demeure inconnu. De précédents résultats ont permis de mettre en avant le rôle délétère du RM, exprimé dans les cellules musculaires lisses, dans la phase aiguë de l'ischémie-reperfusion. Cependant cet effet protecteur n'est pas conservé lors de la phase chronique. Nos récents résultats ont permis de mettre en avant le rôle fondamental du RM exprimé dans le macrophage dans les conséquences chroniques de l'ischémie-reperfusion. Nous supposons donc que le macrophage joue un rôle majeur dans le développement ou la résolution des effets chroniques de l'ischémie-reperfusion via sa capacité à réguler positivement ou négativement l'inflammation successive à l'intervention. Afin d'étayer cette hypothèse, nous souhaitons étudier l'évolution des effets de l'ischémie-reperfusion rénale de sa phase aiguë à sa phase chronique chez des souris transgéniques invalidées pour le récepteur minéralocorticoïde dans les macrophages ou les cellules musculaires lisses. Cette évolution sera comparée à l'évolution des paramètres inflammatoires dans des souris opérées et traitées à la spironolactone. Dans un deuxième temps, nous voudrions déterminer le rôle précis du RM dans les pathologies chroniques et envisageons pour cela de travailler sur le modèle d'obstruction urétérale unilatérale afin de mimer les maladies rénales chroniques sur une période relativement courte et pouvoir mieux comprendre le rôle du macrophage dans son développement. Nous espérons que les résultats de ces travaux seront le préalable à des études cliniques au cours desquelles les antagonistes du RM seront utilisés, notamment en transplantation rénale. D'après notre expérience dans des modèles animaux proches et en se basant sur la littérature, nous aurons besoin d'un groupe de 15 souris minimum pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et aussi pour pouvoir apprécier les différents résultats (un total de 915 souris, sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans). Nos modèles de souris intéressent plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes différents. Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude.

5372. Malgré de nombreux progrès thérapeutiques, le nombre de patients souffrant d'insuffisance cardiaque continue de progresser de façon dramatique, soulignant l'importance de l'étude des mécanismes impliqués dans cette pathologie. Il a été montré que l'aldostérone (Aldo), via l'activation du récepteur minéralocorticoïde (RM), joue un rôle majeur dans le remodelage cardiovasculaire (CV) en participant à l'hypertension, à la fibrose et à l'inflammation. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent ce rôle sont encore mal connus. L'objectif de notre étude est donc de comprendre les mécanismes impliqués dans les effets délétères de l'activation du RM, et en particulier dans le système CV. Une nouvelle cible du RM a été identifiée par le laboratoire,

la Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) et nous avons montré qu'elle jouait un rôle majeur dans les effets physiopathologiques de l'aldo dans le modèle expérimental associant infusion d'aldostérone, administration de sel et uninephrectomie (challenge NAS) qui est utilisé depuis plus de 20 ans pour induire une hypertension artérielle dépendante des minéralocorticoïdes. Les souris présentant une invalidation génique pour NGAL (KO NGAL) sont protégées contre l'hypertension induite par l'aldostérone, ce qui suggère un rôle de NGAL dans la régulation de la réabsorption rénale de sodium et de potassium, grand modulateur de la pression artérielle. De plus, NGAL est retrouvé dans plusieurs contextes inflammatoires souvent associés aux mécanismes de remodelage cardiaque et rénal ainsi que dans la mise en place de l'hypertension artérielle.

(1) Nous voulons donc étudier d'une part le rôle de NGAL dans les mécanismes inflammatoires induits par l'aldo en réalisant une expérience de greffe de moelle osseuse provenant de souris KO NGAL chez des souris WT irradiées afin d'obtenir un modèle de souris chimères présentant une invalidation génique de NGAL dans les cellules immunitaires. Ces souris seront ensuite soumises au challenge NAS afin d'évaluer l'implication du NGAL inflammatoire dans les effets de l'aldo.

(2) D'autre part, nous voulons étudier le rôle de NGAL dans la régulation du transport rénal de sodium et de potassium grâce à l'utilisation de souris KO NGAL soumises à des régimes riches ou pauvres en sodium et en potassium.

(3) Finalement, nous voulons évaluer l'interaction entre ces deux mécanismes grâce à l'étude du rôle de la NGAL produite par les cellules immunitaires dans la régulation rénale de sodium et de potassium. Pour ce faire, nous combinerons le protocole de transplantation de moelle osseuse décrite en (1) avec les régimes riches et pauvres en sodium et potassium décrits en (2).

Nous avons estimé, sur la base de notre expérience avec ces modèles animaux, que pour avoir des résultats statistiquement différents, environ 14 souris par groupe sont nécessaires. Pour chaque expérience nous utiliserons 4 groupes différents : un groupe de souris contrôle non traitées, un groupe de souris contrôle traitées, un groupe de souris génétiquement modifiées non traitées et enfin un groupe de souris génétiquement modifiées traitées.

Compte tenu des différentes expériences que nous allons mettre en place, un total de 892 souris sera utilisé afin de finaliser ce projet qui durera 5 ans dans les meilleures conditions.

Dans les procédures (1) et (3), les animaux irradiés et greffés sont des animaux commerciaux WT (C57Bl6). Les animaux donneurs de moelle sont quant à eux des animaux transgéniques issus de notre lignée KO NGAL.

Dans la procédure (2), les animaux utilisés sont des animaux transgéniques de notre lignée KO NGAL.

Mise en œuvre pratique des 3R :

- Remplacement

Nos modèles animaux sont utilisés pour étudier des mécanismes physiologiques visibles uniquement à l'échelle de l'animal. Toutes les études plus spécifiques sur des mécanismes plus délimités seront effectuées avec des cultures cellulaires.

- Réduction

Sous certaines conditions, nous pourrions utiliser les résultats des groupes contrôles obtenus au cours d'études précédentes, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Cette substitution ne sera possible que si, par exemple, l'âge des animaux est le même et si les conditions d'hébergement des animaux sont les mêmes.

De plus, nos modèles de souris intéressent plusieurs équipes qui travaillent sur d'autres sujets de recherche et sur d'autres organes. Donc les organes sur lesquels ne nous travaillons pas pourront être récoltés par d'autres équipes afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés.

- Raffinement

Les protocoles thérapeutiques, les points limites et les critères d'interruption de l'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de cette étude.

Les points limites ont été définis selon Morton et Griffiths (1985). Au cours de l'expérience, des mesures physiologiques sont effectuées régulièrement. L'animal est sacrifié en cas d'une chute significative de son poids de plus de 20% par rapport à son poids initial (de façon brutale ou progressive) au cours de la durée de l'expérimentation (mesures prises le lendemain de l'intervention, par la suite une fois par semaine jusqu'à la fin du protocole).

5373. L'insuffisance cardiaque est une pathologie sévère caractérisée par une incapacité du cœur à assurer sa fonction de pompe et à irriguer correctement les organes périphériques. Cette déficience est due à des facteurs divers et variés. Ainsi, une diminution des capacités bioénergétiques, une modification des propriétés contractiles, une altération de l'architecture cellulaire du muscle cardiaque lié à une anomalie du cytosquelette conduisent à des phénomènes de remodelage cardiaque (hypertrophie/dilatation) aboutissant dans un deuxième temps à l'insuffisance cardiaque. D'autre part, une altération des propriétés mécaniques des vaisseaux provoquent aussi des altérations de la fonction cardiaque. Au niveau moléculaire, ce phénomène de remodelage est caractérisé par une altération des programmes d'expression des gènes cardiaques avec notamment l'expression de gènes cardiaques fœtaux. L'induction de ces gènes est régulée par une série de facteurs de transcription comme SRF et Ctip2. Ces deux facteurs font l'objet d'étude au sein de notre équipe. L'altération du cytosquelette cellulaire conduit aussi à des phénomènes de remodelage cardiaque. Ainsi une anomalie des gènes codant pour les filaments intermédiaires comme la Desmine et la Synémine peuvent conduire à des pathologies cardiaques. L'objectif de notre étude est d'analyser les fonctions cardiaques et musculaires de Ctip2 et la Synémine à travers l'inactivation de ces gènes à un temps précis chez la souris. Nous avons appliqué à ce projet les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Nous avons réalisé des expériences préliminaires en cultures cellulaires qui confirment l'importance de ces gènes pour la régulation de l'activité transcriptionnelle dans les cardiomyocytes et le maintien de l'architecture cellulaire. Pour le présent projet, le choix de l'expérimentation animale se justifie par le fait qu'il n'est pas possible de reproduire en culture la fonction cardiaque, vasculaire et musculaire telle qu'elle se retrouve dans l'animal entier (organisation structurale, régulations neuro-hormonale, influence de la dépense énergétique globale de l'organisme). Les souris déficientes pour ces protéines seront exposées à des molécules stimulant l'hypertrophie cardiaque puis sacrifiées pour analyser les paramètres

morphologiques et moléculaires (ARN et protéine). Ainsi, l'utilisation du même cœur pour les 3 types d'analyse (morphologie, ARN et protéine) permet de diviser par trois le nombre de souris nécessaires. Le principe de réduction est appliqué par le calcul de puissance statistique de nos tests basés sur des expériences de même type dans d'autres modèles de souris qui nous permettent de réduire à 7-10 souris par groupe le nombre de souris utilisées. Ce projet nécessitera l'utilisation de deux lignées de souris, les souris déficientes en *ctip2* et les souris déficientes en *synémine*. 42 souris par lignée ainsi qu'un nombre équivalent en souris contrôles seront utilisées. Ainsi 168 souris en total sont prévues pour l'ensemble des procédures. L'ensemble de ces interventions sera réalisé sous anesthésie et avec administration d'analgésique en cas de besoin. Enfin, la définition du point limite est clairement établie à partir d'un seuil d'insuffisance cardiaque observé qui déclenchera l'arrêt de l'expérience et l'euthanasie.

5374. La fibrose hépatique est la conséquence de mécanismes, de réparation tissulaire et de réactions inflammatoires, chroniques et non résolus. Elle est caractérisée par une augmentation du dépôt de protéines matricielles qui désorganisent l'architecture des organes touchés. La fibrose hépatique est une résultante commune aux pathologies chroniques du foie, qu'elles soient d'origine virale (hépatite C), parasitaire, biliaire, auto-immune ou consécutive à une stéatohépatite alcoolique ou non alcoolique (NASH= acronyme anglosaxon pour Non Alcoholic Steato Hepatitis) dont l'origine est cette fois d'ordre métabolique. La progression de la fibrose hépatique conduit à terme à la cirrhose, source de morbidité et de mortalité élevées.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de la NASH et de la fibrose hépatique. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de ces pathologies, et ainsi de pouvoir proposer à terme de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les pathologies fibrotiques dont la prise en charge représente des enjeux majeurs de santé publique.

L'évaluation de l'efficacité de nos produits sur les paramètres NASH et fibrose sera réalisée dans un modèle de rongeurs chez qui ces troubles sont induits par un régime, les variantes des procédures expérimentales proposées permettront de mieux cerner les propriétés préventives ou protectrices des produits ou au contraire de mettre en avant une activité dite curative.

L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de la fibrose hépatique sera réalisée au cours de la durée de 5 ans couverte par ce projet avec 6800 souris et 6800 rats.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R's. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système physiologique complexe et intégré. La fibrose hépatique est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux.

Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle du raffinement, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

5375. Le but de cette étude est de prouver la supériorité de l'activité anti-tumorale de l'Aflibercept comparativement au Bevacizumab sur des xéno greffes de cancer colorectal humain HCT-116 répondant à ces deux traitements.

Pour cela nous souhaitons effectuer un « switch » d'un traitement à l'autre après 14 jours de traitement.

Ce modèle cellulaire sera injecté à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

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

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

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 75 souris.

Nous espérons mettre en évidence que le traitement par l'Aflibercept permettra une diminution de la croissance tumorale plus importante que le Bevacizumab (résultat déjà confirmé dans de précédentes études) et que le changement de traitements permettra une stabilisation de la croissance tumorale (Bevacizumab vers Aflibercept).

Type d'animaux : Souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux : ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 75 souris expérimentales pour une durée maximale de 5ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 :

« Règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Les études in-vitro déjà menées ont permis de sélectionner/affiner au mieux les conditions expérimentales du projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. En effet, cette étude ne peut être conduite qu'in vivo car celle-ci prend en considération la tumeur, son environnement ainsi que l'ensemble des interactions mise en jeu. Ainsi, il n'y a pas de modèles alternatifs au modèle animal permettant de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements proposés.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. De précédentes études déjà effectuées nous permettent de savoir le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux.

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

5376. Les maladies auto-immunes constituent un grave problème de santé publique puisqu'elles sont devenues la 3ème cause de morbidité dans le monde après les maladies cardiovasculaires et les cancers. Elles touchent 10% de la population mondiale, hommes, femmes, enfants mais dans plus de 75% des cas il s'agit de femmes. On estime qu'une femme sur 6 est ou sera atteinte d'une maladie auto-immune au cours de sa vie.

Une maladie auto-immune est une pathologie provoquée par un dysfonctionnement du système immunitaire. Chez un individu normal, des lymphocytes B producteurs d'anticorps et les lymphocytes T reconnaissent nos propres cellules et leurs composants (ADN, noyau, protéines...), ils protègent normalement nos organes, tissus et cellules des agressions extérieures provenant de virus, bactéries ou champignons. Pour des raisons encore inconnues, ces éléments se trompent d'ennemi et se mettent à attaquer nos propres organes et cellules.

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par un dérèglement de la balance Th17/ Treg. Les lymphocytes Th17 activés vont produire des interleukines 17, des cytokines pro-inflammatoires et ainsi entraîner une inflammation et c'est alors que les symptômes apparaissent.

Dans ce projet nous traiterons les souris pour évaluer les propriétés immuno-modulatrices de nos composés, et nous utiliserons le modèle « Concanavaleine A ». Le processus est complexe et il requiert le recours à l'animal. Les maladies auto-immunes étant des maladies inflammatoires, elles sont caractérisées par leur caractère chronique ce qui signifie qu'elles sont d'évolution lente, persistantes et sans tendance à la guérison. L'étude de ces maladies in vivo nécessite la mise en place de modèles animaux et de protocoles de longue durée avec un degré de gravité qualifié de sévère notamment pour l'étude de la sclérose en plaques et le modèle EAE (encéphalomyélite autoimmune expérimentale). Dans le but de respecter la règle des 3R donc de limiter le nombre d'animaux utilisés, leur douleur ou inconfort, nous souhaitons tester ces molécules sur des protocoles très courts afin de réaliser un screening vivo qui permettrait de sélectionner les meilleures d'entre-elles avant de les tester sur des animaux atteints de pathologies à des stades de sévérité plus avancés.

Le projet présenté ici fait appel à un modèle animal de HAI (hépatite auto-immune), chez lesquels la pathologie est volontairement induite et qui permet de cibler spécifiquement une voie de différenciation de cellules inflammatoires et de la neutraliser.

Ce programme utilisant des animaux qui permet d'étudier le processus complexe de protection via l'immunomodulation s'insère dans un programme complet de découverte de médicaments dont l'objectif est la mise sur le marché de nouvelles molécules ayant des effets thérapeutiques.

Cette stratégie nous permet de définir préalablement des points limites éthiquement et scientifiquement acceptables, en tenant compte des objectifs de l'étude.

Ce projet engagera des animaux dans un nombre estimé à 3480 individus pour la durée que couvrira ce projet. Le nombre d'animaux utilisé dans chaque lot de cette procédure est réduit, il correspond au seuil minimal qui puisse nous permettre d'apprécier avec nos moyens techniques et en fonction de la variabilité inter-individus les effets désirés.

A terme nos travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies auto-immunes, aujourd'hui ce besoin médical est clairement établi.

5377. Les maladies auto-immunes constituent un grave problème de santé publique puisqu'elles sont devenues la 3ème cause de morbidité dans le monde après les maladies cardiovasculaires et les cancers. Elles touchent 10% de la population mondiale, hommes, femmes, enfants mais dans plus de 75% des cas il s'agit de femmes. On estime qu'une femme sur 6 est ou sera atteinte d'une maladie auto-immune au cours de sa vie.

Une maladie auto-immune est une pathologie provoquée par un dysfonctionnement du système immunitaire. Chez un individu normal, des lymphocytes B producteurs d'anticorps et les lymphocytes T reconnaissent nos propres cellules et leurs composants (ADN, noyau, protéines...), ils protègent normalement nos organes, tissus et cellules des agressions extérieures provenant de virus, bactéries ou champignons. Pour des raisons encore inconnues, ces éléments se trompent d'ennemi et se mettent à attaquer nos propres organes et cellules.

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par un dérèglement de la balance Th17/ Treg. Les lymphocytes Th17 activés vont produire des interleukines 17, des cytokines pro-inflammatoires et ainsi entraîner une inflammation et c'est alors que les symptômes apparaissent.

Dans ce projet nous traiterons les souris pour évaluer les propriétés immuno-modulatrices de nos composés, et nous utiliserons le modèle « anti-CD3 induced cytokines release ». Le processus est complexe et il requiert le recours à l'animal. Les maladies auto-immunes étant des maladies inflammatoires, elles sont caractérisées par leur caractère chronique ce qui signifie qu'elles sont d'évolution lente, persistantes et sans tendance à la guérison. L'étude de ces maladies in vivo nécessite la mise en place de modèles animaux et de protocoles de longue durée avec un degré de gravité qualifié de sévère notamment pour l'étude de la sclérose en plaques et le modèle EAE (encéphalomyélite auto-immune expérimentale). Dans le but de respecter la règle des 3R donc de limiter le nombre d'animaux utilisés, leur douleur ou inconfort, nous souhaitons tester ces molécules sur des protocoles très courts afin de réaliser un screening vivo qui permettrait de sélectionner les meilleures d'entre-elles avant de les tester sur des animaux atteints de pathologies à des stades de sévérité plus avancés.

Dans un souci permanent du bien-être animal et afin de minimiser l'emploi des animaux de laboratoire, l'évaluation des molécules sera réalisée en priorité dans des modèles in vitro. Les molécules ayant prouvé un potentiel thérapeutique dans ces études feront alors l'objet d'une évaluation chez l'animal.

2400 animaux seront utilisés sur cinq années afin d'évaluer le potentiel thérapeutique des composés. Par ailleurs, l'hébergement des animaux pendant la phase d'acclimatation et pendant l'expérimentation sera faite avec enrichissement du milieu afin d'améliorer leur bien-être.

5378. La maîtrise des gestes techniques expérimentaux réalisés sur les animaux de laboratoire est un gage de préservation du bien-être animal et de qualité scientifique. C'est également une obligation réglementaire pour toute personne amenée à mettre en œuvre des procédures expérimentales.

Ce projet a pour objectif de couvrir les besoins en formation du personnel dans le cadre de la formation initiale ou du suivi des compétences, de garantir la meilleure préparation du personnel à la mise en œuvre des procédures expérimentales ainsi qu'à la manipulation des animaux au sein de notre Centre de Recherche.

Les gestes réalisés (ex : administration, prélèvement, contention, préparation à la chirurgie) seront d'un degré de gravité réel au maximum modéré. En fonction du geste technique considéré, les animaux pourront être anesthésiés dans le premier temps de la formation et une analgésie sera mise en place.

Dans les cas où cela est possible, les formations sont réalisées, par ordre de préférence :

- sans avoir recours à l'animal vivant : formations virtuelles de type e-learning, matériaux synthétiques, animaux morts ou euthanasiés dans le cadre d'autres projets
- avec recours à l'animal vivant lorsque cela est indispensable : animaux surnuméraires ou animaux issus d'une procédure expérimentale antérieure et répondant aux critères de réutilisation

Si aucun animal n'est disponible, des animaux seront commandés spécifiquement pour les besoins de formation.

Afin de réduire le nombre global d'animaux utilisés dans notre Centre de Recherche, les prélèvements effectués dans le cadre de la formation pourront être conservés en vue d'études sur cellules ou tissus isolés.

Les animaux pourront également être réutilisés pour d'autres formations après une période de récupération et avis favorable d'un vétérinaire en accord avec les principes de réutilisation indiqués dans la réglementation.

Les études réalisées au sein du Centre de Recherche ont toutes pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal.

Le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans sera au maximum de : 750 souris, 400 rats, 75 cobayes, 75 hamsters, 75 lapins, 10 porcs, 10 chiens.

5379. L'arthrose est la pathologie rhumatologique la plus fréquente chez l'humain. Elle se caractérise par la présence de lésions tissulaires (os et cartilage) se traduisant cliniquement par des douleurs et une gêne fonctionnelle de l'articulation touchée. Des travaux récents menés au sein de notre laboratoire ont montré le rôle de l'interleukine 6 (IL-6) dans la dégradation de cartilage observée lors de l'arthrose. En effet, nous avons démontré que l'inhibition de l'IL-6 ou de sa principale voie de signalisation par administration d'inhibiteurs spécifiques permet de réduire les lésions d'arthrose chez la souris. L'IL-6 semble donc jouer un rôle majeur dans le développement de l'arthrose.

Grâce à des outils de séquençage « haut débit », nous avons pu identifier les gènes-cibles de l'IL-6 dans le chondrocyte, la cellule spécifique du cartilage articulaire. Parmi ces cibles, nous avons identifié qu'une protéine inhibitrice des protéases à sérine, la SerpinA3N, était particulièrement régulée par l'IL-6 dans le cartilage. Les protéases à sérine sont des enzymes responsables de la dégradation de diverses protéines, et donc le site actif présente un acide aminé particulier, la sérine.

Des études récentes sur d'autres modèles et nos données préliminaires suggèrent que, par son activité inhibitrice de protéases, la SerpinA3N pourrait notamment réguler l'activité d'enzymes responsables de la dégradation du cartilage au cours de l'arthrose. Néanmoins, les résultats obtenus in vitro avec des molécules sur des cultures cellulaires ne permettent pas de conclure à un effet sur une pathologie aussi complexe que l'arthrose, en raison de multiples interactions cellulaires et tissulaires au sein de l'articulation.

Il apparaît que l'induction d'une arthrose chez la souris peut reproduire la pathologie sur l'ensemble des tissus. Cette induction consiste à pratiquer une ménisectomie (ablation chirurgicale d'un ménisque) sur le genou droit. Ce modèle est le seul à intégrer les différents tissus de l'articulation avec les possibilités de modifications génétiques ciblées, c'est pourquoi il a été retenu. Nous pouvons ainsi, grâce à ce modèle animal, évaluer le potentiel thérapeutique d'une cible donnée (comme la SerpinA3N dans notre

cas) soit en l'inactivant, soit en la « suractivant ». Dans le but de démontrer l'implication de la SerpinA3N dans l'arthrose nous nous proposons donc de procéder en deux étapes :

1) Dans un premier temps, nous analyserons les conséquences de l'absence de la SerpinA3N sur le développement de l'arthrose. Pour ce faire, nous utiliserons des souris chez qui l'expression du gène codant pour la SerpinA3N sera totalement abolie dans le cartilage.

2) A l'inverse, nous évaluerons dans un deuxième temps l'effet de l'administration par injections intra-articulaires de SerpinA3N dans les genoux des souris après méniscectomie.

Nous effectuerons ainsi deux expérimentations :

- La première sur 2 groupe de 20 souris mâles (l'un n'exprimant pas la SerpinA3N dans le cartilage, l'autre oui). Pour cette première expérimentation, toutes les souris seront opérées sur le genou droit pour induire l'arthrose, le genou gauche non opéré servant de contrôle afin de réduire au plus le nombre d'animaux participants.

- La seconde expérimentation portera sur 2 groupes de 20 souris mâles dites « sauvages », c'est à dire non modifiées génétiquement. Pour celle-ci, les 2 groupes seront opérés sur le genou droit, le genou gauche servant de contrôle. Un groupe de souris recevra des injections intra-articulaires de SerpinA3N, et l'autre groupe sera le groupe contrôle, et recevra du PBS (solvant non actif de la SerpinA3N, utilisé comme placebo).

Les résultats obtenus nous permettront de mieux comprendre le rôle de la SerpinA3N au cours de l'arthrose murine et d'évaluer sa pertinence en tant que cible thérapeutique.

Pour cette étude, l'utilisation de 80 animaux sur une période maximale de 2 ans apparaît adéquate pour garantir une puissance statistique satisfaisante. Afin de limiter le nombre d'animaux nécessaire aux expérimentations, la méniscectomie sera faite uniquement sur la patte droite, la patte gauche servant de témoin. L'animal est ainsi son propre témoin.

Pour chaque souris, une injection sous-cutanée d'antalgiques (Buprénorphine) sera faite 15 minutes avant l'intervention chirurgicale, laquelle sera pratiquée sous anesthésie générale. Six heures plus tard, nous procéderons à une nouvelle injection d'antalgiques. Si dans les 24 heures une modification du comportement de l'animal était constatée (apathie, attitude défensive, agitation anormale, vocalismes), des injections supplémentaires de ce médicament, à raison d'une toutes les 12 heures seraient réalisées.

Les animaux hébergés dans des conditions standards pendant 6 semaines par groupe de 6 feront l'objet d'une observation comportementale et physique 3 fois par semaine. Tout signe de mal être ou de souffrance, s'exprimant chez un animal par une modification du comportement comme indiqué plus haut et/ou se manifestant par d'autres signes tels qu'un pelage hérissé ou terne, une perte de poids, une boiterie fera l'objet de mesures adaptées : injection de Buprénorphine aux mêmes doses que les premières, nourriture dans la cage sous forme de gelées riches en nutriment... Si aucun des moyens dont nous disposons pour améliorer son état de santé ne s'avéraient satisfaisants, nous procéderions alors à son euthanasie.

5380. L'incidence des maladies rénales chroniques est en progression constante et représentent actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 2,5 millions de personnes. Malgré les progrès accomplis par la médecine moderne les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces. En effet, les malades qui arrivent en stade terminal sont au nombre de 70000 environ, ce qui représente 2% des dépenses d'assurance maladie. De plus cette population augmente de 3% par an pour les patients dialysés et 5% pour les patients greffés. Le but de ce projet est d'étudier d'une part le rôle de la connexine 43 (Cx43) dans le développement de la maladie rénale. Le rein étant un tissu constitué de plusieurs compartiments, les différents modèles cellulaires ne suffisent pas pour étudier les mécanismes qui conduisent à la régression progressive de la fonction rénale et au dérèglement de la balance sodée par exemple le rôle des cellules immunitaires. La greffe de moelle osseuse est un modèle expérimental permettant d'étudier la contribution des cellules myéloïdes à un phénotype rénal.

Pour étudier le rôle de la Cx43 sur la fonction rénale, nous disposons de modèles de néphropathie expérimentale bien établis chez la souris qui permettent de travailler sur différents types de pathologies rénales comme l'hypertension, la glomérulonéphrite, la néphropathie obstructive ou encore certaines complications associées à la transplantation. Pour l'étude de la maladie rénale chronique, ce sont des modèles bien établis qui produisent une altération progressive du tissu rénal et donc très fiables pour révéler des biomarqueurs utiles de la progression de la maladie. Nous savons déjà que la Connexine 43 est une protéine importante lors de l'apparition de la maladie rénale. Elle est stimulée dans de nombreuses cellules du rein (glomérule, épithélium rénal, cellules immunitaires infiltrantes). Ce projet va nous permettre de déterminer le rôle de la connexine 43 des cellules immunitaires infiltrant le rein lors de la maladie rénale. Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux afin de respecter la règle des 3 R. Afin de d'étudier le rôle de la connexine 43 des cellules immunitaires dans l'apparition de la maladie rénale chronique, nous utiliserons 448 souris génétiquement modifiées durant une période de 5 ans. Afin de garantir le bien-être des animaux une surveillance quotidienne après les procédures expérimentales et le recours à des analgésiques sont mis en place. Le projet de déroulera sur deux établissements d'expérimentation où les souris seront successivement étudiées. De cette manière, nous espérons proposer entre autre que la connexine 43 est une nouvelle cible thérapeutique pour éviter aux patients la dialyse ou à terme la transplantation.

5381. Le cancer colorectal (CRC) est le 3ème cancer le plus diagnostiqué dans le monde en 2012. De nouvelles thérapies, ciblant la néoangiogénèse tumorale, sont en cours d'études cliniques. Elles sont d'abord évaluées dans des modèles animaux de cancer colorectaux humains greffés en sous cutané, avant d'être transférées en clinique chez l'Homme. Une des thérapies antiangiogéniques récemment approuvées pour le traitement du cancer CRC métastatique est l'afflibercept.

En se liant au VEGF-A, au PIGF, et au VEGF-B, l'aflibercept bloque l'activation des récepteurs du VEGF et la prolifération des cellules endothéliales, inhibant ainsi la croissance des nouveaux vaisseaux qui alimentent les tumeurs en oxygène et nutriments. Dans cette étude, le but est d'évaluer in vivo les effets de l'Aflibercept sur le métabolisme tumoral à l'aide de l'imagerie non invasive par Tomographie à Emission de Positons (TEP). Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Nous souhaitons voir si l'imagerie TEP peut être prédictive de la réponse au traitement. Nous utiliserons deux radiotraceurs TEP, le 18F-FDG, traceur du métabolisme glucidique utilisé en clinique et 68Ga-RGD, un radiotraceur spécifique de l'intégrine  $\alpha\beta_3$ , utilisable en imagerie TEP. Les examens avec tous les traceurs TEP seront pratiqués de façon séquentielle avant et après traitement dans un modèle de souris porteuses de deux types de cancer CRC métastatique humain, la lignée HCT-116 et la lignée LS174T (12 souris au total)

De plus, afin de raffiner au mieux les expérimentations, les animaux porteurs de tumeurs auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (euthanasie anticipée en cas d'atteinte des points limites) et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

5382. La néoangiogenèse tumorale est une cible pour la thérapie en oncologie, les cellules endothéliales des néovaisseaux surexpriment certains récepteurs dont l'intégrine  $\alpha\beta_3$ . C'est une protéine membranaire liant le motif peptidique RGD (Arg-Gly-Asp). L'imagerie moléculaire de tomographie à émission de positon (TEP) avec un radioligand de l'intégrine  $\alpha\beta_3$  pourrait visualiser le potentiel d'angiogenèse des localisations macroscopiques cancéreuses, en un seul examen non-invasif du corps entier. Les glioblastomes (GB) sont des tumeurs cérébrales très agressives et très vascularisées pour lesquelles les traitements actuels ne permettent pas d'augmenter la durée de survie des patients. De nouvelles stratégies thérapeutiques visant l'angiogenèse tumorale sont en cours d'études cliniques, certaines ont pour cibles l'inhibition des facteurs angiogéniques et/ou de leurs récepteurs et des voies de signalisation qui en dépendent, comme les anti-VEGF (Bevacizumab), d'autres sont des antagonistes des intégrines, molécules impliquées dans la néo angiogénèse. L'IRM est actuellement la modalité d'imagerie anatomique d'évaluation des GB mais sa performance reste limitée pour délimiter la tumeur, évaluer son pronostic, sa réponse suite à un traitement, déceler une reprise évolutive.

Le motif RGD décrit ci-dessus, couplé à un radionucléide devient un radioligand spécifique de l'intégrine  $\alpha\beta_3$ , utilisable en imagerie TEP. Ce dernier pourrait servir de « compagnon diagnostique » afin d'obtenir des informations moléculaires nécessaires à la prise en charge adéquate des patients. En clinique, l'imagerie TEP pourra aider au choix du traitement et à la détermination précoce de son efficacité ou de l'absence de réponse afin de s'orienter rapidement vers un autre choix thérapeutique, sans attendre une toxicité sans efficacité. C'est la base de la thérapie personnalisée.

Les objectifs du projet sont de comparer, sur des modèles animaux xenogreffés par une lignée cellulaire de GB humain, plusieurs radiotraceurs TEP. Ces radiotraceurs seront composés du modèle peptidique RGD, marqué soit au 18F soit au 68Ga. Le RGD marqué au F18 sera fourni par PET NET solution alors que celui marqué au Ga68 sera marqué au sein de la plateforme LIMP. Les examens avec tous les traceurs TEP seront pratiqués de façon séquentielle dans un ordre randomisé dans un modèle de souris porteuse de GB humain.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Pour la 1ere partie du projet 6 souris saines permettront d'évaluer la biodistribution in-vivo sur 1.5 heures en imagerie TEP de chaque radiotraceur (3 souris / traceur). Ces mêmes souris seront ensuite greffées avec des cellules de glioblastome humain (U87MG) et le même protocole d'imagerie sera réalisé lorsque les tumeurs atteindront un volume de 300 mm<sup>3</sup>.

Pour la 2eme partie du projet 20 souris permettront d'évaluer l'effet d'un traitement anti-angiogénique le Bevacizumab seul ou avec chimiothérapie, à l'aide de la TEP avec le 18F-RGD et 68Ga-RGD.

Différents critères de comparaison seront étudiés, dont la lisibilité des images avec une quantification du rapport tumeur/bruit de fond, pour prédire l'efficacité du traitement.

De plus, afin de raffiner au mieux les expérimentations, les animaux porteurs de tumeurs auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (euthanasie anticipée en cas d'atteinte des points limites) et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive). Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

5383. L'incidence des maladies rénales chroniques est en progression constante et représentent actuellement un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Ainsi en France les maladies rénales d'origine diverses touchent plus de 2,5 millions de personnes. Malgré le progrès accomplis par la médecine moderne les traitements actuels ne sont que partiellement efficaces. En effet, les malades qui arrivent en stade terminal sont au nombre de 70000 environ, ce qui représente 2% des dépenses d'assurance maladie. De plus cette population augmente de 3% par an pour les patients dialysés et 5% pour les patients greffés. Le but de ce projet est d'étudier d'une part le rôle de la connexine 43 (Cx43) dans le développement de la maladie rénale. Le rein étant un tissu constitué de plusieurs compartiments, les différents modèles cellulaires ne suffisent pas pour étudier les mécanismes qui conduisent à la régression progressive de la fonction rénale et au dérèglement de la balance sodée par exemple le rôle des cellules

immunitaires. La greffe de moelle osseuse est un modèle expérimental permettant d'étudier la contribution des cellules myéloïdes à un phénotype rénal.

Pour étudier le rôle de la Cx43 sur la fonction rénale, nous disposons de modèles de néphropathie expérimentale bien établis chez la souris qui permettent de travailler sur différents types de pathologies rénales comme l'hypertension, la glomérulonéphrite, la néphropathie obstructive ou encore certaines complications associées à la transplantation. Pour l'étude de la maladie rénale chronique, ce sont des modèles bien établis de qualité qui produisent une altération progressive du tissu rénal et donc très fiables pour révéler des biomarqueurs utiles de la progression de la maladie. Nous savons déjà que la Connexine 43 est une protéine importante lors de l'apparition de la maladie rénale. Elle est stimulée dans de nombreuses cellules du rein (glomérule, épithélium rénal, cellules immunitaires infiltrantes). Ce projet va nous permettre de déterminer le rôle de la connexine 43 des cellules immunitaires infiltrant le rein lors de la maladie rénale. Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux afin de respecter la règle des 3 R. Afin de d'étudier le rôle de la connexine 43 des cellules immunitaires dans l'apparition de la maladie rénale chronique, nous utiliserons 448 souris génétiquement modifiées durant une période de 5 ans. Afin de garantir le bien-être des animaux une surveillance quotidienne après les procédures expérimentales et le recours à des analgésiques sont préconisés. Le projet se déroulera sur deux établissements d'expérimentation où les souris seront successivement étudiées. De cette manière, nous espérons proposer entre autre que la connexine 43 est une nouvelle cible thérapeutique pour éviter aux patients la dialyse ou à terme la transplantation.

5384. Malgré de grandes avancées dans le domaine médical, la cardiomyopathie dilatée (CMD) reste une maladie cardiaque invalidante avec des taux de morbidité et de mortalité élevés, représentant une cause majeure de transplantation cardiaque. Toutes les formes de CMD convergent vers un remodelage par étirement des cardiomyocytes et des défauts d'énergie conduisant à une dilatation du ventricule gauche et à une défaillance systolique. Le but de ce projet est d'identifier et de tester l'efficacité de la stimulation de voies de signalisation liées aux gènes SRF, actine cardiaque et MRTFA maintenant la contractilité et la structure des cellules cardiaques afin de prévenir le développement d'une insuffisance cardiaque terminale dans un modèle de CMD humaine liée à une mutation du gène *lamine-A/C* (maladie de Emery Dreifuss) réalisée chez la souris. L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut être complètement remplacée par des cultures cellulaires. De plus, l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, certaines expériences seront réalisées sur des cultures primaires. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement). Une planification minutieuse a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les fonctions cardiovasculaires sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux. Les souris sont euthanasiées en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. L'insuffisance cardiaque est induite en respectant au maximum les procédures du bien-être animal et en limitant la souffrance par le respect des méthodes anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'ils ne subissent aucun stress. Afin d'améliorer leurs conditions d'hébergement, de l'enrichissement sera ajouté dans leurs cages. Ce projet nécessite de croiser plusieurs souris transgéniques et génère 6 groupes d'études : 1 groupe malade (*ki/ki Lmna*), 2 groupes malade corrigé par 2 transgènes différents (*ki/ki Lmna surexActc1*; *ki/ki Lmna surexSRF*), 1 groupe contrôle sauvage (*WT/WT Lmna*), 2 groupes contrôles expérimentaux portant seulement les transgènes correcteurs (*WT/WT surexActc1*; *WT/WT surexSRF*). En utilisant une approche statistique, nous avons calculé que 264 souris pour 2 temps d'analyse seront nécessaires pour observer les différences attendues avec un niveau de confiance de 95% et une puissance de 80.

5385. La maladie d'Alzheimer, une maladie neurodégénérative incurable liée à l'âge, débute 10 à 15 ans avant d'être diagnostiquée faute de marqueurs diagnostiques précoces. Le diagnostic tardif conditionne la mise en place de traitements à des stades de maladie où la pathologie est déjà irréversible. Or, la longue phase pré-symptomatique (préclinique) de la maladie ouvre une fenêtre thérapeutique pendant laquelle les traitements pourraient être plus efficace. La recherche de biomarqueurs diagnostiques du stade pré-symptomatique est donc devenue une des priorités de santé publique au niveau mondial à cause du vieillissement des populations.

Les déficits de vision sont nombreux dans la maladie d'Alzheimer et les altérations histopathologiques caractéristiques de stades avancés de la maladie sont similaires dans la rétine et dans le cerveau. Du point de vue anatomique et développemental, la rétine fait partie du cerveau mais contrairement à ce dernier, elle est bien plus accessible aux explorations non-invasives grâce à la transparence de l'œil. En transposant à la rétine la stratégie et la méthodologie que nous avons récemment validée dans le cerveau, nous rechercherons si les altérations subtiles de phénotype et de fonctionnement de cellules gliales et neuronales de la rétine y seraient détectables avant de l'être dans le cerveau.

Pour ce faire, nous utiliserons comme modèle une souris transgénique APP/PS1Ed9 qui porte deux mutations. Une des mutations concerne la protéine précurseur de l'amyloïde-beta (APP), et l'autre la sous-unité 1 de la présénile (PS1), l'enzyme impliqué dans le clivage terminal de l'APP en l'amyloïde-beta. Ce produit final du clivage de l'APP joue le rôle causal dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Nous rechercherons tout d'abord si les premières étapes de clivage de l'APP par l'enzyme BACE1 coïncident avec l'engagement de cellules gliales sur la voie d'activation lors des stades pré-symptomatiques de la maladie d'Alzheimer. Notre hypothèse est que cette activation gliale se produit même avant l'accumulation significative de l'amyloïde-beta. Nous étudierons par la suite les effets de l'induction initiale de cytokines par les cellules gliales sur le contrôle de l'activité

synaptique de neurones. Cette dernière est connue pour être affectée le plus précocement dans la maladie d'Alzheimer, bien avant l'accumulation de l'amyloïde-beta et les symptômes cognitifs. Nous testerons enfin l'effet d'un inhibiteur de l'enzyme (BACE1) catalysant le clivage originel de la protéine APP sur l'engagement de cellules gliales dans la voie d'activation et sur l'excitabilité synaptique de neurones de la rétine.

Le total estimé de souris à utiliser durant les 5 années est de 800, donc 160 souris par an. Ce nombre est relativement élevé car il est indispensable d'étudier les 2 sexes séparément (en moyenne 80 souris par an pour chaque sexe, avec 40 souris transgéniques et 40 souris contrôles de souche sauvage par an pour chaque sexe). Nous avons respecté strictement le principe de 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) afin de réduire le nombre de souris à ce minimum. Il n'existe pas d'alternative expérimentale à l'utilisation de souris puisque il s'agit d'évaluer les altérations impliquées dans les mécanismes cognitifs (remplacement). Concernant la Réduction, nous avons divisé le nombre de souris à utiliser par 2 étant donné que l'imagerie rétinienne par tomographie à cohérence optique (OCT) et l'électrorétinogramme (ERG) seront pratiqués successivement chez les mêmes animaux. Cela est possible car il s'agit des examens non-invasifs, réalisés cliniquement chez l'homme. Plus généralement, nous réaliserons une veille bibliographique afin de s'assurer que les expériences envisagées n'ont pas été publiées dans la littérature scientifique. De plus, afin de limiter le nombre d'animaux, nous utiliserons un groupe contrôle commun aux expérimentations (sans traitement) et nous validerons les données, si les résultats sont cohérents entre eux, par une analyse statistique. Enfin, si notre hypothèse de départ pour l'une ou l'autre des analyses envisagées n'est pas validée par les résultats, celle-ci sera immédiatement arrêtée. Quant au principe de Raffinement, nous mettrons en place des mesures antalgiques appropriées. Nous préserverons systématiquement les aliquotes des extraits congelés d'ARN et de protéines obtenus de nos souris transgéniques et contrôles. L'objectif étant de pouvoir réaliser des expériences supplémentaires selon l'évolution de nos études en termes de maturation de l'hypothèse initiale, sans avoir recours forcément à des animaux supplémentaires.

5386. Le rein a pour rôle principal d'excréter les substances non utiles à l'organisme qui sont ingérées ou produites par le métabolisme. Il participe ainsi au maintien de l'homéostasie du milieu intérieur de l'organisme. Pour assurer cette fonction, le rein est capable d'adapter ses fonctions de transport en réponse aux variations environnementales, en particulier aux variations des apports alimentaires. Cette capacité d'adaptation résulte de plusieurs mécanismes en fonction de l'intensité/la durée des variations de l'environnement : a) activation de systèmes préexistants, b) synthèse de nouveaux transporteurs, et c) augmentation du nombre de cellules responsables de la fonction concernée. Le présent projet vise à étudier les modalités de ce dernier mécanisme de prolifération cellulaire, et son impact sur l'homéostasie.

Le projet est focalisé sur la prolifération des cellules du tubule collecteur rénal qui sont le siège de l'excrétion d'acide et, le cas échéant, de la réabsorption de potassium, et sont ainsi responsables du contrôle final de l'excrétion de la charge acide et du potassium et du maintien de l'homéostasie acido-basique et potassique.

Notre étude portera principalement sur les réponses adaptatives à une charge acide alimentaire, une carence alimentaire en potassium ou un traitement à la vasopressine.

La réalisation du projet nécessitera l'étude de plusieurs lignées de souris: souris C57BL/6J, souris invalidées pour les gènes codant pour Gdf15, pour les sous unités alpha1 et alpha2 de l'AMP kinase (AMPK), pour la H,K-ATPase de type 2, pour p53 et pour le récepteur GPR4, souris transgéniques exprimant l'EGFP sous un promoteur spécifique des cellules intercalaires (souris b1-EGFP). Application du principe des 3R : s'agissant d'étudier un processus physiologique impliquant plusieurs tissus et organes, seuls les modèles animaux permettent de répondre aux questions posées, à l'exclusion de tout modèle cellulaire. Le nombre total d'animaux a pu être réduit à 1512 sur la base de nos études précédentes montrant que des groupes de 6 animaux sont suffisants pour atteindre une signification statistique. Par ailleurs, chaque animal est utilisé pour réaliser un maximum d'analyses différentes en fin de protocole. Enfin tout sera mis en œuvre pour garantir le minimum de stress et de douleur au cours de l'hébergement préalable aux expériences (mise en œuvre des procédures d'enrichissement développées par notre centre d'exploration fonctionnelles) et au cours des procédures.

5387. Dans les cardiomyocytes, la fonction contractile est régulée principalement par les voies de deux messagers secondaires: le calcium et l'AMP cyclique. Lors de l'insuffisance cardiaque il y a une diminution de la production de l'AMP cyclique, ce qui se traduit par la baisse de la contractilité. Dans le but d'améliorer la contractilité lors de l'insuffisance cardiaque, nous avons créé un modèle de souris avec surexpression dans le cœur de l'enzyme de synthèse de l'AMP cyclique: l'adénylyl cyclase type 8. Le projet est fondé sur les données préliminaires concernant l'expression de l'AC8 dans le cœur de souris transgénique et a pour but d'élargir l'étude au compartimentation de voies de l'AMPc dans le cœur qui peut aussi être la cible de la thérapie génique.

L'objectif scientifique de ce projet est d'évaluer l'intérêt de l'augmentation de la synthèse de l'AMP cyclique dans le cœur lors de vieillissement et/ou l'insuffisance cardiaque et à étendre l'état des connaissances quant à la compartimentation des voies de l'AMPc dans le cœur. Ce projet d'en envisager développé de nouvelles traitements de l'insuffisance cardiaque plus adaptées à différents types de cardiomyopathies".

Le recours à l'étude d'animaux transgéniques surexprimant AC8 dans le cœur est essentiel. Nous allons effectuer un suivi de la fonction cardiaque chez les animaux transgéniques et leurs contrôles en cours de vieillissement (2 -14 mois) par l'échocardiographie transthoracique. Les animaux seront sacrifiés à 2, 6 et 14 mois pour les études de morphométrie et de biochimie. Le nombre total d'animaux utilisé est 80 (6 lots de 10 + 20 pour la mortalité élevée chez les HAC8). Sur l'animal mort sera réalisée une collecte du cœur pour l'analyse morpho-métrique, histologique et analyse biochimique et moléculaires.

Tout au long de ces études in vivo, nous allons respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensable chez l'animal. Avant toute expérimentation, un protocole expérimental sera soigneusement rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de respecter leur bien-être.

5388. La grippe est une maladie aiguë des voies respiratoires, due à une infection par le virus influenza. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les virus influenza sont responsables, chaque année, de 3 à 5 millions de cas graves d'infections dans le monde, entraînant 200 000 à 500 000 décès. La grippe constitue donc un problème majeur de santé publique.

L'objectif de cette étude est d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'inflammation durant les infections grippales et notamment d'étudier le rôle de l'hémostase dans l'inflammation induite par les virus de la grippe. Ceci nous permettra d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques contre la grippe. Nous testerons en particulier les rôles de l'argatroban (inhibiteur de la thrombine), du ticagrelor (inhibiteur du récepteur plaquettaire P2Y12) et d'un antifibrinolytique (aprotinine). En ciblant une molécule de l'hôte et non le virus, cette stratégie a pour avantage de limiter l'apparition de virus résistants au traitement.

Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux et la souris apparaît comme l'espèce la plus adaptée aux types de recherches envisagées, en tenant compte de l'expérience des membres du projet utilisant cette espèce pour les infections virales ainsi que les données de la littérature scientifique.

Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chance d'obtenir des résultats satisfaisants, statistiquement significatifs. Afin de limiter la douleur, les souris seront surveillées et pesées chaque jour, y compris les weekends et les jours fériés, et au premier signe de douleurs les souris seront euthanasiées immédiatement.

Par ailleurs, afin de limiter et de prévenir toute souffrance et angoisse des animaux, nous mettrons en œuvre des mesures d'acclimatation de 7 jours après leur arrivée en zone d'hébergement. Afin d'élever le bien être de l'animal, les cages seront enrichies notamment avec du coton, aucun hébergement individuel n'est prévu et les expériences seront menées par le même expérimentateur du début à la fin.

Nombre total d'animaux inclus dans ce projet est : 396

5389. En permanence le cerveau reçoit des informations internes qui le renseignent sur l'état des viscères (niveau d'oxygène, réserves énergétiques, mouvements des viscères, température, etc.). Ces informations sont véhiculées jusqu'au cerveau par différents nerfs périphériques et notamment par le nerf vague. Les messages nerveux ainsi véhiculés arrivent directement au niveau d'une région appelée le noyau du tractus solitaire (NTS). L'information périphérique y est traitée puis envoyée vers diverses régions du cerveau et de la moelle épinière. Ces différentes voies de sorties ont des implications fonctionnelles distinctes, telles que les réponses réflexes vitales, les régulations homéostatiques complexes, et la conscience du soi.

Au niveau du NTS, la transmission de l'information périphérique se fait au niveau de synapses excitatrices qui utilisent comme neurotransmetteur le glutamate.

Un premier volet de notre projet s'intéresse au fonctionnement de ces synapses qui pourraient présenter des propriétés particulières en fonction de la voie de sortie considérée. Un deuxième volet vise à étudier les conséquences de l'état nutritionnel sur le fonctionnement de ces synapses.

L'objet d'expérimentation sera le cerveau de rat adulte qui est le modèle couramment utilisé et le plus approprié pour ce type d'étude de physiologie intégrée qui nécessite de travailler sur des animaux vivants. L'ensemble des investigations nécessitera l'utilisation d'environ 600 rats sur une période de 4 à 5 ans, ce qui correspond au nombre minimum nécessaire pour valider nos résultats. De plus, un soin particulier est apporté tout au long de la vie des rats, qui sont élevés dans un microenvironnement enrichi, pour éviter tout type de souffrance et/ou de stress.

5390. L'adénocarcinome du pancréas humain (PDAC) est l'un des cancers les plus redoutables et meurtriers dans le monde. Il représente la quatrième cause de décès par cancer au niveau mondial. En l'absence de progrès dans sa prise en charge, les données actuelles prédisent que le PDAC sera la seconde cause de mortalité par cancer en 2030. Le taux de survie ne dépasse pas 20% à 1 an avec une moyenne de survie de 3 à 4 mois après le diagnostic. L'une des raisons des échecs thérapeutiques est la présence d'un environnement immunosuppresseur très fort, due à l'activation de cellules particulières du système immunitaire qui vont favoriser le développement de la tumeur au lieu de la combattre. Ces cellules, principalement les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), sont des acteurs clés dans l'échappement tumoral du PDAC, et leur ciblage est de plus en plus exploré dans des approches thérapeutiques.

Objectif du projet: il consistera à identifier, caractériser puis à cibler et bloquer les interactions entre les MDSC et les Treg dans un modèle de souris C57bl/6J et C57bl/6 génétiquement modifiée pour ne pas exprimer de Treg, de cancer du pancréas pour contrecarrer les effets immunosuppresseurs induits par la tumeur et permettre ainsi une réactivation des réponses immunitaires anti-tumorales.

Avantages du modèle et dommages attendus pour l'animal: Ce modèle animal de cancer du pancréas consistera en une transplantation d'une tumeur pancréatique dans le pancréas d'une souris provenant d'une tumeur sous-cutanée développée après injection de cellules tumorales pancréatiques de souris de la lignée Panc02. Ce modèle est un des rares modèles nous permettant de reproduire les caractéristiques de l'environnement tumoral, en particulier la mise en place par la souris (suite au développement

tumoral), d'un environnement immunosuppresseur au travers de la production et l'activation de MDSC et Treg, reflétant ainsi ce qui peut se passer chez les patients. Ce modèle va nous permettre d'isoler ces cellules pour les caractériser et les utiliser dans des tests fonctionnels *in vitro* afin de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'échappement tumoral et de bloquer ces mécanismes pour permettre une réactivation d'une réponse immunitaire anti-tumorale.

Nombre total d'animaux utilisés: 192 réparties dans 2 protocoles expérimentaux.

1. Le protocole expérimental n°1 sera réalisé sur 22 souris C57bl/6J réparties en plusieurs groupes et reproduit 3 fois pour obtenir des valeurs statistiques ( $22 \times 3 = 66$  souris au total). Ce protocole consistera, après transplantation d'une tumeur pancréatique, à faire produire par la souris des cellules MDSC et Treg. 9 jours après la transplantation, les souris seront euthanasiées puis le pancréas + tumeur, la rate, la moelle osseuse et le sang seront prélevés (1) pour caractériser les MDSC et Treg par immunohistochimie, (2) isoler et mettre en culture *in vitro* ces cellules, les caractériser et réaliser de tests fonctionnels.

2. Le protocole expérimental n°2 sera réalisé sur 42 souris dont 10 souris C57bl/6-Tg(Foxp3-DTR/EGFP) réparties en plusieurs groupes et reproduit 3 fois pour obtenir des valeurs statistiques ( $42 \times 3 = 126$  souris au total). Ce protocole consistera, après transplantation d'une tumeur pancréatique, à traiter ces souris pour qu'elles ne produisent que des MDSC ou des Treg. La suite de l'expérimentation sera identique au protocole 1.

Conformité avec les exigences des 3R:

1. Remplacement: Ce modèle animal ne peut être remplacé car il va nous permettre de reproduire les caractéristiques de l'environnement tumoral immunosuppresseur, en particulier la production par la souris, suite au développement tumoral, de cellules MDSC et Treg qui seront isolées, caractérisées et utilisées dans des tests fonctionnels *in vitro*.

2. Réduction: Dans le souci de réduire la quantité d'animaux, le nombre par groupe a été minimisé. Il se justifie par le fait d'avoir assez de matériels tissulaires et cellulaires pour réaliser les différentes expériences *in vitro*, gommer les différences inter-individuelles et obtenir des résultats statistiquement exploitables (utilisation du test non-paramétrique de Mann-Witney).

3. Raffinement: Les critères de raffinement suivants seront appliqués:

- Un délai de 7 jours sera respecté entre la réception des animaux et les transplantations de tumeurs.
- Les animaux auront accès *ad libitum* à l'eau et la nourriture jusqu'au jour de l'intervention.
- Les animaux seront toujours répartis par groupe de 2 ou 5 auquel sera ajouté de l'enrichissement (jouet, coton, nids ...) dans toutes les cages.
- Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale par sévofluorane associés à un traitement antalgique pré et post-opératoire.
- Le prélèvement de la tumeur sous-cutanée pour transplantation pancréatique sera réalisée avant qu'elle n'atteigne un volume de 150mm<sup>3</sup> (point limite toléré pour ce type d'expérience: 1000mm<sup>3</sup>) puisque peu de matériel tumoral est nécessaire pour une transplantation orthotopique (2mm<sup>3</sup>). Les expérimentations réalisées par le passé sur ce modèle ainsi que les données de la bibliographie montrent que la tumeur pancréatique se développe et reste localisé au niveau du pancréas pendant les 15 premiers jours après transplantation. Les animaux seront donc euthanasiés au 9<sup>ème</sup> jour pour les prélèvements des différents organes.
- Durant la période de croissance tumorale, les signes comportementaux seront surveillés pour éviter tout développement d'une souffrance animale. Une grille d'évaluation de la douleur sera utilisée selon les critères suivants:
- Paramètres physiologiques: mesure hebdomadaire du poids de l'animal et de la prolifération tumorale.
- Comportement (observation quotidienne): dynamisme et postures de l'animal (postures générale et faciale, comportement exploratoire).
- Apparence physique externe (observation quotidienne): aspect de la peau (cicatrisation de la plaie chirurgicale suite à la greffe orthotopique, blessure, morsures), et sur un plan général (déshydratation, abdomen creux, troubles urinaires ou défécatoires, consistance et quantité des selles).
- Si un comportement de souffrance est observé, un antalgique sera administré.
- Les euthanasies seront réalisées par dislocation cervicale sous anesthésie générale dans une pièce d'expérimentation isolée des pièces d'hébergements et de ses congénères.

5391. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité thérapeutique de 2 nouveaux candidats médicaments administrés en topique dans un modèle murin de dermatite atopique induite par l'application d'un extrait protéique d'acarien.

Les 2 candidats médicaments testés dans ce protocole sont des inhibiteurs de la phosphodiesterase 4 (PDE4) et l'activité thérapeutique de ces composés sera comparée à celle d'un médicament de référence (corticoïde=triamcinolone acetonide).

Parmi les différentes espèces animales utilisées en expérimentation, la souris est l'animal le mieux adapté pour le développement de modèles immunologiques. Nous utiliserons un modèle murin de dermatite atopique permettant l'étude des mécanismes physiopathologiques qui gouvernent l'induction et le contrôle de la maladie, ainsi que de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 302 souris. Le protocole est planifié de telle sorte que plusieurs analyses sont réalisées sur le même animal. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte avec la mise en place de mesures antalgiques appropriées, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier, d'une maisonnette et de tubes en plastique). L'étude conduite dans ce projet ne peut être conduite qu'*in vivo* et fait suite à un package d'études *in vitro* qui ont illustré l'activité anti inflammatoire de ces composés (remplacement).

5392. Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) exogène. La complication majeure de ce traitement est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII qui neutralisent le FVIII thérapeutique. L'apparition de cette réponse immunitaire complique la prise en charge médicale des patients, réduit dramatiquement la qualité de vie des patients et augmente énormément les coûts du traitement/prévention des hémorragies. Notre objectif est de comprendre les raisons de l'immunogénicité du FVIII. Nos travaux récents démontrent que l'activation du complément joue un rôle dans le développement de la réponse immunitaire anti-FVIII. Ainsi, l'élimination transitoire de la molécule C3 du complément au moment de l'injection de FVIII chez la souris hémophile A sévère (FVIII-KO) réduit-elle de deux fois la réponse immunitaire anti-FVIII. In vitro, l'endocytose du FVIII est accrue de deux fois si le complément s'active, et si du C1q purifié est ajouté au milieu de culture. L'objectif de ce projet est de déterminer l'importance des molécules C1q et C3 du complément dans la réponse immunitaire anti-FVIII chez la souris FVIII-KO. Le nombre total maximal de souris estimé sur la base de prédictions statistiques pour ce projet est de 300 souris.

Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

Remplacement : le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale *in vivo* permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes *in vitro* pour analyses ultérieures.

Réduction : Nous réduisons le nombre d'animaux par une analyse préalable poussée de la littérature scientifique pour maximiser les approches expérimentales. Des expériences *in vitro* seront menées en amont pour optimiser les méthodes et diminuer au maximum le nombre d'animaux par lots. Ainsi, des analyses de puissance seront effectuées pour calculer le nombre minimum d'animaux par groupe tout en garantissant la solidité statistique des résultats.

Raffinement : les souris seront hébergées en accord avec la réglementation et l'éthique françaises. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les animaux malades seront soignés ou euthanasiés. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

5393. L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. De plus, il a été démontré que le système immunitaire joue un rôle principal dans la réponse anti-tumorale.

Le but de ce projet est de tester des nouvelles stratégies de vaccination anti-tumorales. Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes *in vitro*. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris C57Bl/6 immunocompétentes (n= 3528). Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences de vaccination et croissance tumorale, donc l'utilisation d'animaux vivants. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôlés. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et nous prévoyons des mesures antalgiques appropriées. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés.

5394. Le maintien d'un épithélium alvéolaire fonctionnel est critique pour la fonction pulmonaire et nécessite un mécanisme de réparation efficace en réponse aux agressions. Les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) sont souvent lésées lors d'agressions alvéolaires, entrant massivement en apoptose. Elles jouent cependant un rôle central dans la réparation de l'épithélium et dans la physiopathologie de maladies telles que la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Ces pathologies constituent des affections sévères du poumon distal, au pronostic sombre pour les patients. Bien qu'elles soient étudiées depuis de nombreuses années, leur physiopathologie demeure incomplètement comprise.

Ces maladies sont souvent associées à des événements d'hypoxie alvéolaire, du fait du remodelage pulmonaire ou de la présence d'un œdème alvéolaire, qui peut aggraver per se leur progression en stimulant leur apoptose ou leur transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ainsi, mieux comprendre les facteurs et mécanismes affectant la fonction des CEA représente un enjeu majeur pour le traitement de ces pathologies pulmonaires. Aucun traitement efficace n'existe à ce jour, mais, dans différents modèles murins d'agression alvéolaire, l'administration de cellules souches mésenchymateuses humaines (CSMh) exerce un effet bénéfique global sur les animaux par un mécanisme paracrine encore mal élucidé, et représente ainsi une voie thérapeutique prometteuse.

Ainsi, notre projet s'articule autour de deux axes majeurs :

- caractériser la réponse des CEA à l'hypoxie

- caractériser l'effet protecteur des CSMh sur les CEA soumises à l'hypoxie.

L'accès à des prélèvements pulmonaires de patients est très limité, et il est actuellement très difficile d'isoler de façon régulière des CEA provenant de poumons humains. Ainsi, afin de mener notre étude, nous utiliserons des CEA de rats à l'aide de deux protocoles. D'une part, nous réaliserons des cultures primaires des CEA après extraction et isolement de CEA de poumons de rats ; d'autre part, nous réaliserons des cultures organo-typiques à partir de coupes fines de poumons (« precision cut lung slices » ou PCLS) de rats.

Ce projet s'insère dans la continuité d'un projet préalable et dont les résultats ont été publiés. Il se déroulera sur 5 ans et nécessitera environ 110 rats par an, soit un total de 550 rats. Afin de respecter le principe de raffinement, le personnel travaillant avec les animaux possède le diplôme en expérimentation animale de niveau I ou II. Les conditions de traitement des rats et la méthodologie utilisée viseront à limiter au mieux une éventuelle souffrance que pourraient ressentir les animaux. Par ailleurs, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, nous utiliserons autant que possible des lignées cellulaires de substitution telles que les cellules A549 pour la mise au point de protocoles ou la réalisation de techniques très consommatrices de cellules. Cependant, ces lignées restent des substituts imparfaits car leur origine tumorale rend certains mécanismes clés différents de ceux des CEA primaires (transports ioniques, apoptose), ce qui implique le recours au modèle animal pour ce projet.

5395. Le rein contrôle la composition hydro-électrolytique de l'organisme en adaptant l'excrétion dans l'urine des ions, de l'eau et des déchets. Cette fonction est rendue possible grâce à un grand degré de complexité phénotypique et de spécialisation fonctionnelle des cellules épithéliales rénales. En particulier, le canal collecteur qui est situé dans la partie finale du néphron et qui joue un rôle crucial dans la régulation fine de l'homéostasie est caractérisé par un épithélium hétérogène. On distingue ainsi les cellules principales qui assurent le transport de l'eau, du sodium et du potassium, les cellules intercalaires A qui secrètent de l'acide et absorbent des bases, et les cellules intercalaires B qui secrètent des bases, absorbent de l'acide et participent également à la réabsorption de chlorure de sodium. Ces cellules intercalaires jouent un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Pour étudier la formation de ces cellules et leur différenciation, il n'existe aucun modèle cellulaire (remplacement). De plus pour comprendre la régulation qui s'exerce dans ces cellules lors de l'adaptation à différentes conditions environnementales (charge en sel, charge acide et en base), seul un modèle animal peut répondre à ces questions. Un nouveau modèle de marquage fluorescent des cellules B chez la souris a été généré. L'objectif de ce projet est de déterminer la signature moléculaire de ces cellules B et d'étudier leur comportement lors de l'adaptation à différentes conditions environnementales (charge en sel, charge acide et en base). Différentes procédures expérimentales permettront de déterminer si ce système est impliqué dans la régulation de la pression artérielle et de l'état acidobasique.

Nous estimons que 180 souris seront nécessaires à ce programme de recherche de 5ans. Une cinquantaine de souris serviront à maintenir l'élevage. Nous adapterons le nombre d'animaux à la baisse dans le respect de la règle des 3R si les protocoles ou les résultats de nos expériences le permettent. Pour le raffinement, des mesures antalgiques appropriées seront mises en œuvre. Un enrichissement de l'environnement des animaux sera également entrepris : pipette d'abreuvement automatique, nids végétaux, tunnels en carton ou maison/igloo en plastique, litière en copeaux, pas d'animaux isolés lors de l'élevage. Les animaux sont hébergés dans des conditions d'hygrométrie et de température adaptées à l'espèce. Une alternance jour/nuit est en place dans les zones d'élevage et d'expérimentation pour respecter le rythme chronobiologique des animaux. Ces conditions sont surveillées en permanence par logiciel via des capteurs de mesure. Lors des expériences, des points limites ont été définis permettant d'exclure les animaux en souffrance.

Un modèle animal pour l'étude d'un système intégré comme le fonctionnement du rein est nécessaire pour tester nos hypothèses, un bon modèle cellulaire n'est pas disponible pour les cellules rénales.

5396. Le cisplatine ou cis-diaminedichloroplatinum (II) est couramment utilisé au cours des chimiothérapies néo-adjuvantes ou adjuvantes chez les patients atteints de tumeurs solides variées telles que les cancers de la tête et du cou, du poumon, de l'ovaire, de la prostate, du colon ou encore les cancers issus de cellules germinales. Alors que le traitement par le cisplatine s'avère efficace chez 80% des patients atteints d'un cancer testiculaire à cellules germinales, dans de nombreux autres types de cancers, en dépit de réponses initiales prometteuses, le bénéfice thérapeutique est rapidement limité par le développement d'une résistance des cellules cancéreuses à cet agent. Un ensemble de données récentes suggère que l'oncogenèse et la progression tumorale sont intimement associées aux altérations du métabolisme cellulaire. Récemment, des altérations du métabolisme cellulaire responsables de la résistance au cisplatine ont été identifiées dans des cancers de différentes origines tissulaires et nous avons montré in vitro que ces altérations métaboliques s'accompagnaient d'une sensibilité accrue à la privation nutritionnelle. Par ailleurs, cette restriction calorique potentialise la mort des cellules cancéreuses induite par des agents chimio-thérapeutiques.

Le but de ce projet est de tester l'effet anti-tumoral de la privation nutritionnelle seule ou associée à des agents chimio-thérapeutiques sur l'animal afin d'envisager une nouvelle approche thérapeutique chez l'homme. Pour cela, nous effectuerons des expériences de greffes de cancers pulmonaires (humains ou murins) résistants ou sensibles au cisplatine chez des souris qui seront soumises à des manipulations expérimentales bien tolérées et nous évaluerons la croissance tumorale et la survie de l'animal. Ce projet ne peut être mené que dans un système intégré, donc in vivo (remplacement). Les traitements seront groupés de façon à limiter le nombre de souris (un maximum de 800 souris est envisagé pour un projet qui se déroule sur 3 ans). Nous avons choisi les agents/conditions qui se sont révélé(e)s les plus efficaces in vitro et qui sont connus pour leur bonne tolérance chez la souris selon la littérature. Les effets bénéfiques escomptés sont une réduction de la croissance tumorale et une augmentation de la survie des souris significatives. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou

tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Nous pensons que la réalisation de ce projet fournira des connaissances sur les caractéristiques métaboliques des cancers résistants au cisplatine pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées chez les patients.

5397. L'atrophie multi-systématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative sporadique rare et d'étiologie inconnue touchant plus de 3000 personnes en France. L'AMS se traduit par un syndrome parkinsonien et une ataxie, conduisant à une grave invalidité motrice, ainsi que par une dys-autonomie engendrant des troubles respiratoires, cardiaques et urogénitaux. L'espérance de vie moyenne après la déclaration de l'AMS est inférieure à 9 ans et il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement disponible pour atténuer la sévérité des symptômes ou la progression de cette maladie dévastatrice. L'AMS se caractérise par la présence d'inclusions cytoplasmiques contenant la protéine alpha-synucléine (SYN) agrégée dans les oligodendrocytes. Selon plusieurs données expérimentales, l'agrégation de la SYN serait à l'origine des déficits moteurs et du processus neurodégénératif de l'AMS.

Du fait de la gravité, de la rapidité et de la généralisation du processus neurodégénératif, le développement de traitements neuroprotecteurs capables de ralentir l'évolution de la maladie constitue un besoin urgent.

Plusieurs études ont mis en évidence une diminution de l'autophagie dans l'AMS. L'autophagie est un processus cellulaire permettant la dégradation et le recyclage de protéines ou d'organelles. Il semble donc que l'altération de l'autophagie dans l'AMS puisse participer à favoriser l'accumulation de la SYN et ainsi contribuer au processus neurodégénératif.

Le but de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique de la rapamycine, une molécule capable de stimuler l'autophagie afin de déterminer son intérêt pour traiter l'AMS dans un modèle de souris transgénique surexprimant la protéine alpha-synucléine (lignée PIP-SYN). Si cette lignée n'a pas de phénotype nocif pouvant altérer sa qualité de vie, elle montre néanmoins un léger déficit moteur, détectable au court de tests comportementaux qui analysent une motricité fine. La rapamycine un médicament actuellement utilisé comme immunosuppresseur dans les greffes rénales et bénéficie d'une autorisation d'utilisation délivrée par l'agence européenne du médicament. Cette molécule sera ajoutée dans la nourriture à deux concentrations différentes, à des souris PIP-Syn ou à leurs contrôles. L'effet de cette molécule sera évalué par des tests comportementaux faisant appel au comportement moteur spontané de l'animal sans contention. Le cerveau des animaux sera prélevé après mise à mort pour des analyses histologiques.

L'utilisation de tests comportementaux nécessite d'avoir recours à des animaux vivants. Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 48 souris incluant les groupes expérimentaux et leurs contrôles. Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée actuelle n'indique que la rapamycine soit susceptible d'entraîner une souffrance chez les animaux. De plus, la rapamycine incorporée dans la nourriture des animaux, évitera le recours à des injections ou des gavages. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape de notre projet.

5398. La maladie de Parkinson (MP) est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes qui touche rien qu'en France plus de 150 000 personnes de plus de 65 ans et qui se caractérise par la perte d'un type de neurones, ceux qui synthétisent la dopamine. Les ganglions de la base (GB) sont un ensemble de régions cérébrales qui contrôlent l'exécution du mouvement volontaire et qui dysfonctionnent dans la MP lorsque la dopamine vient à manquer dans le cerveau. Dans ce réseau, la région nommée globus pallidus externe (GPe) joue un rôle prédominant dans l'exécution et l'arrêt des mouvements, mais son fonctionnement reste mal compris en raison du manque de connaissance sur les connexions nerveuses qu'il établit avec le reste du réseau.

Dans ce projet, nous souhaitons étudier les connexions qui arrivent et qui partent du GPe avec les autres structures du réseau des GB en situation normale et "parkinsonienne". Nous utiliserons ici une approche récente, l'optogénétique qui est une technique permettant de modifier l'activité des neurones grâce à des protéines sensibles à la lumière. Il faut dans un premier temps apporter dans le cerveau ces protéines que l'on trouve normalement dans des algues. Pour cela, nous avons besoin de faire des chirurgies stéréotaxiques de vecteurs permettant l'expression de ces protéines sensibles à la lumière. Pour modéliser la MP, une partie des animaux recevront, de manière concomitante avec l'injection de vecteurs d'optogénétique, une injection intracérébrale de neurotoxine, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) alors que les témoins auront reçu la solution véhicule de la 6OHDA, du chlorure de sodium. La neurotoxine permet de cibler précisément les neurones à dopamine.

Le recours à des modèles *in vitro* n'est donc pas pour l'heure, possible car nous avons besoin du cerveau entier pour étudier les connexions du GPe (Remplacement de la règle des 3R). Nous utiliserons au maximum 506 souris afin d'en réduire le nombre tout en ayant assez de données pour établir des statistiques solides (Réduction). Dans le cadre du Raffinement, les douleurs générées par les chirurgies seront soulagées par l'utilisation de molécules adaptées. Les animaux 6OHDA auront un suivi particulièrement adapté aux troubles générés par ce modèle bien connu de maladie invalidante avec la définition de points limites adaptés à ce modèle.

5399. Du fait de l'apparition des résistances associée à la relative pénurie de nouvelles molécules, le traitement des infections est devenu un problème de santé publique majeur, en particulier chez les patients traités pour des infections sévères dans les services de réanimation. Ainsi, le bon usage des antibiotiques inclut l'optimisation du choix, du dosage et de la durée des traitements des

infections. L'optimisation posologique des antibiotiques se fait généralement à partir de la détermination de leurs concentrations au niveau plasmatique et non au site de l'infection. Cette pratique est particulièrement problématique pour des tissus protégés par des barrières physiologiques comme le cerveau. En effet dans ce cas les concentrations dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou le liquide extracellulaire (LEC) peuvent être très inférieures (10 à 20 fois) aux concentrations plasmatiques libres correspondantes. Des transporteurs d'efflux comme la glycoprotéine-P, présente au niveau des barrières cérébrales diminuent la pénétration cérébrale d'un certain nombre de molécules. Ainsi, la morbi-mortalité des infections cérébro-méningées reste élevée, avec une mortalité des infections post-opératoires variant de 18 à 42%.

Les données dans la littérature sur la diffusion centrale des antibiotiques sont peu nombreuses du fait de la difficulté d'accessibilité au cerveau. C'est pourquoi, le LCR plus facile d'accès que le tissu cérébral sert souvent de marqueur de la distribution centrale des médicaments. Il existe 2 possibilités de prélever du LCR chez l'homme, soit par ponction lombaire, soit par dérivation ventriculaire externe (DVE). La DVE est constituée d'un cathéter implanté chirurgicalement dans un des ventricules latéraux, relié à une tubulure externe comportant un système de recueil gradué stérile. Elle permet de contrôler le débit du liquide céphalo-rachidien (LCR) et de faire baisser la pression intracrânienne et est donc indiquée dans certains cas d'hypertension intracrânienne. Cette DVE peut donc être utilisée pour recueillir de LCR afin de mesurer des concentrations de médicaments au niveau de ce liquide. Mais, ce type de dispositif étant implantés chez des patients de réanimation, les inclusions de type de patients en recherche clinique restent difficiles et rares dans cette population. L'extrapolation inter-espèce entre le rat et l'homme permettrait de pallier à ce déficit d'inclusion et donc à ce manque de données. En effet, grâce à des modèles pharmacocinétiques-physiologiques, il est possible de simuler des profils de concentrations cérébrales chez l'homme à partir de données provenant d'études expérimentales animales dans le but d'optimiser les posologies sur différents anti-infectieux. C'est pourquoi, l'objectif de cette étude est d'explorer, chez le rat, la pharmacocinétique dans le LCR de plusieurs agents anti-infectieux indiqués dans le traitement des infections cérébro-méningées communautaires et nosocomiales, afin de réaliser ensuite des extrapolations chez l'homme pour optimiser les posologies.

Les agents anti-infectieux explorés seront des antibiotiques indiqués dans le traitement des abcès cérébraux ou des méningites communautaires, le métronidazole, le céfotaxime, et des anti-infectieux indiqués dans le traitement des infections cérébro-méningées nosocomiales, le méropénème, la ceftazidime, la colistine, l'aztréonam pour le traitement des bacilles à GRAM négatif, la daptomycine et le linézolide pour les cocci à GRAM positif, la micafongine et la caspofongine pour les levures.

360 rats vont être utilisés pour cette étude de distribution cérébrale de 10 agents anti-infectieux. Nous avons pris en considération dans l'élaboration du protocole la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) pour minimiser en particulier le nombre d'animaux utilisés. Ainsi pour réduire le nombre d'animaux, des méthodes statistiques appropriées associées à un travail de modélisation pharmacocinétique en aval vont nous permettre de réaliser des comparaisons entre les agents anti-infectieux. Concernant le principe de remplacement, il n'existe pas de modèle alternatif qui mime les concentrations dans le plasma et dans le LCR à la suite d'une administration de substance médicamenteuse. Le raffinement est pris en compte pendant l'expérimentation, à savoir que l'administration et les prélèvements sanguins et dans le LCR seront réalisés chez des rats présentant une anesthésie générale associée à une anesthésie locale.

Cette recherche est innovante et pourrait apporter une véritable innovation sur l'optimisation thérapeutique des agents anti-infectieux grâce à l'extrapolation inter-espèce, information qui n'est actuellement pas disponible dans la littérature.

5400. La transmission de contaminants par l'eau, en particulier d'agents biologiques ou de toxines, est identifiée de longue date : épidémies de choléra, de fièvres typhoïdes, etc. L'utilisation malveillante (bioterrorisme) de cette capacité de l'eau potable à disséminer des agents biologiques a conduit la France à s'armer d'un réseau de laboratoires capables de mettre rapidement en œuvre des analyses de levée de doute et d'identification d'agents potentiellement dangereux (dits agents de la menace). Ce réseau national des laboratoires « Piratox-Biotox », créé en 2004 compte 10 laboratoires référents en métropole et dans les DOM-TOM et rassemble plus d'une centaine de laboratoires spécialisés public et privés. La détection, notamment celle des agents microbiologiques, fait majoritairement appel à des techniques traditionnelles de culture in vitro (mise en évidence du caractère pathogène), des techniques immuno-enzymatiques ou moléculaires analytiques et quantitatives.

Le recours à l'expérimentation animale est limité et ne vient qu'en complément des analyses in vitro, et ce uniquement pour des niveaux d'alerte élevée ou en cas de résultats douteux obtenus par les techniques in vitro (principe de remplacement de la règle des 3R). Ainsi, lors d'un événement de contamination accidentelle ou intentionnelle de circuit d'eau potable, notre laboratoire peut être sollicité pour mettre en place des tests sur un effectif réduit de souris permettant de déterminer si l'échantillon d'eau suspect contient un agent toxique entraînant des symptômes cliniques

La demande d'autorisation est faite pour 5 ans, un total de 600 souris est prévu. A chaque test effectué, 6 souris sont utilisées (principe de réduction) et hébergées dans un environnement enrichi (pièces de bois à ronger, igloo, « nestlets » avec respect de points limites définis, principe de raffinement). Une injection intrapéritonéale de l'échantillon d'eau à tester est effectuée et les souris sont mises en observation. L'apparition des premiers symptômes cliniques chez la souris est généralement très rapide (quelques heures à 1 jour pour la toxine botulique et la ricine par exemple) et leur état de santé est observé à différents temps post-injection jusqu'à maximum 72h. Les souris sont ensuite euthanasiées.

Les animaux non utilisés dans le cadre de ce projet (suite à une absence d'alerte) et donc sains, pourront être incorporés dans les procédures d'autres projets développés au laboratoire.