



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

Résumés non techniques des projets autorisés (54)

5401. Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines et de tester l'éventuelle amélioration du phénotype grâce à différentes approches thérapeutiques. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles. Pour comprendre le rôle physiologique des gènes impliqués, et comment les mutations sont responsables de ces pathologies, nous avons dans un premier temps utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la pathophysiologie *in vivo*. Dans le but de mieux comprendre les fonctions des protéines impliquées dans ces pathologies et leurs interactions, dans le muscle sain et pendant le développement des pathologies, nous prévoyons d'utiliser 5 modèles murins pour les myopathies congénitales. L'utilisation de souris est indispensable pour comprendre la physiopathologie *in vivo*.

Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées *in vivo* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une par jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris par groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, elles seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Un maximum de 7080 souris sera utilisé.

5402. La pneumonie aigüe communautaire (PAC) est une infection respiratoire acquise en dehors du milieu hospitalier. La PAC est la première cause de mortalité infectieuse dans les pays occidentaux et représente 450 millions de cas/an dans le monde, avec près de 4 millions de décès. Les bactéries *Streptococcus pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que sur le virus de la grippe sont parmi les pathogènes les plus retrouvés dans ces infections.

De nouvelles stratégies thérapeutiques sont donc essentielles pour améliorer le pronostic vital des personnes infectées. De nouvelles molécules utilisées seules ou en association avec certains antibiotiques ont montré des résultats très prometteurs *in vitro* vis-à-vis (1) de *Streptococcus pneumoniae*, (2) de *Pseudomonas aeruginosa* et (3) du virus grippal. Nous devons à présent démontrer l'efficacité de ces différentes thérapies *in vivo* vis-à-vis de ces trois pathogènes. Au total 4032 souris seront nécessaires pour tester nos différents traitements (projet sur 5 ans avec 7 expérimentateurs titulaires et 4 expérimentateurs contractuels financés pour le projet).

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R, à savoir :

- Remplacement : Jusqu'à présent, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les caractéristiques d'infections respiratoires et le modèle murin constitue un modèle expérimental pertinent jusqu'à ce qu'une méthode alternative validée soit disponible.

- Réduction : Le nombre d'animaux est optimisé en réalisant un maximum d'analyses sur chaque animal (cellules immunitaires, cytokines, expression des gènes, histologie, évaluation de la charge du pathogène, ...).

- Raffinement : Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du sopalin et fragments de boîtes d'œufs. Tout au long du déroulement des expériences, une observation systématique de leur état clinique sera réalisée de façon pluriquotidienne par les animaliers et les expérimentateurs afin de détecter au plus tôt une éventuelle souffrance animale.

5403. La transplantation d'organe consiste à remplacer un organe non fonctionnel par un organe provenant d'un donneur (vivant ou décédé) de la même espèce mais génétiquement différent. Un des principaux risques après une transplantation est le rejet de l'organe greffé. Celui-ci résulte de la capacité du système immunitaire du receveur à discriminer comme étranger le tissu transplanté. Actuellement, on considère que les lésions de rejet sont principalement le fait des lymphocytes T et des anticorps dirigés contre le greffon. Récemment des preuves expérimentales ont montré que le rejet pouvait aussi être induit par l'activation d'une autre population cellulaire : les cellules Natural Killer (NK). Ce type de rejet étant nouveau, l'impact des différents immunosuppresseurs utilisés habituellement en transplantation pour prévenir le rejet est inconnu sur ce type de rejet.

Dans ce projet, réalisé sur un modèle expérimental murin, l'impact des différents traitements immunosuppresseurs utilisés en transplantation sur les cellules NK sera testé.

Pour réaliser ce projet, il est prévu d'injecter des cellules ou de transplanter des greffons cardiaques à des souris traitées par différentes molécules immunosuppressives. Nous analyserons les cellules NK (sur le plan phénotypique et fonctionnel), la lyse des cellules injectées ou la survenue de lésions de rejets sur les greffons en présence des différents immunosuppresseurs pré-cités.

Ce projet devrait permettre d'acquérir des données nouvelles pour aider à prévenir l'activation des cellules NK contre le greffon. Nous espérons ainsi pouvoir retarder le développement des lésions de rejet et prolonger la durée de vie des greffons. Il s'agit d'un objectif prioritaire en transplantation compte tenu de la pénurie d'organe. Ceci pourrait ainsi permettre d'améliorer l'accès à la greffe pour les patients qui le nécessitent.

Ce projet ne peut être mené sans l'utilisation d'animaux car le système immunitaire est un appareil extrêmement complexe comportant un nombre important d'organes et de cellules qui plus est, se déplacent, ce qui est impossible à reproduire *in vitro*.

Des calculs d'effectifs nous ont permis d'établir le nombre minimal d'animaux par groupe pour que les résultats soient significatifs. Le bien-être des animaux sera analysé et pris en compte tout au long du protocole afin de minimiser l'impact des actes expérimentaux, et nous mettrons en œuvre des mesures antalgiques appropriées.

Au total, le nombre d'animaux nécessaires à ce projet est de 1030 souris.

5404. Nous proposons de démontrer sur des porcs la faisabilité d'une approche thérapeutique radicalement nouvelle d'un certain nombre de pathologies (obésité et diabète de type II, mais potentiellement à terme également les pathologies liées à un dysfonctionnement du microbiote). Le principe consiste à implanter à demeure dans l'intestin des patients concernés un "Taenia artificiel" (brevet, avril 2015), constitué d'une « ancre » gastrique et d'un « réacteur » intestinal. Le « réacteur » contient des enzymes ou des bactéries capables de modifier le contenu nutritif du liquide intestinal.

24 animaux en tout sont prévus.

Une première étude sur 4 animaux permettra de démontrer la tolérance par le tractus digestif de la présence permanente du dispositif "Taenia artificiel" et d'identifier la flore intestinale susceptible de coloniser spontanément ce dispositif.

Si la première étude est concluante, une deuxième étude sur 5 séries de 4 animaux permettra de commencer à étudier l'efficacité relative des diverses versions du dispositif.

Règle des 3R

Concernant le remplacement, il est indispensable pour notre projet d'utiliser un animal vivant et il est nécessaire de se rapprocher autant que possible de la physiologie humaine et le porc est un excellent modèle pour cela.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum, car plusieurs variantes de la méthode doivent être testées.

Il est prévu de réduire la souffrance animale par l'utilisation de méthodes antalgiques appropriées.

5405. Les kératites et les abcès de cornée représentent une cause fréquente de perte d'acuité visuelle définitive. Ces infections sont parfois responsables d'opacités séquellaires, de perte fonctionnelle de l'œil, voire d'infections généralisées en cas d'endophtalmies chroniques. De plus, ces infections oculaires causent des douleurs intenses dues à l'irritation des nerfs cornéens par la kératite.

Les ophtalmologistes soignent ces infections de la cornée par des collyres antibiotiques. Ces antibiotiques instillés de manière topique sur l'œil permettent d'obtenir de fortes concentrations cornéennes et intra-oculaires. Les praticiens essaient d'atteindre la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour les germes en cause dans ces infections de cornée.

La classe d'antibiotique qui est reconnue pour être utilisable en monothérapie dans ces infections est la classe des fluoroquinolones. L'action des fluoroquinolones est « concentration-dépendante », c'est-à-dire que leur action est maximale quand la concentration intra-tissulaire est élevée. Il est rare dans la littérature médicale d'obtenir des concentrations intra-oculaires suffisantes pour agir sur les germes les plus résistants et les plus agressifs pour l'œil (*Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*).

L'idée initiale de cette expérience est d'obtenir de très importantes concentrations intra-oculaires en fluoroquinolones par l'intermédiaire d'une lentille de grand diamètre : le verre scléral. Cette lentille possède une interface liquidienne avec la cornée qu'elle recouvre en passant en pont. Cette interface remplie d'antibiotique et laissée plusieurs heures permettrait un contact plus prolongé entre la molécule antibiotique et la cornée, et par voie de conséquence, une pénétration plus importante qu'en instillation standard (collyre). De plus, les verres scléraux ont un effet antalgique grâce à la protection mécanique de la surface oculaire, et en isolant la cornée dans une atmosphère humide.

L'instillation de collyre dans le réservoir du verre scléral a déjà été faite par une équipe de Boston aux USA. Mais il n'existe pas dans la littérature d'études ayant évalué la pénétration intra-oculaire des antibiotiques en utilisant le verre scléral comme diffuseur et réservoir.

Ces concentrations doivent être recherchées dans la cornée, principal substrat des infections bactériennes de l'œil, mais aussi dans l'humeur aqueuse et vitrée. En effet, les bactéries se propagent rapidement en intra-oculaire, infectant l'humeur aqueuse et l'humeur vitrée (tableau d'endophtalmie).

Intérêt d'une étude pré-clinique sur cobayes animaux :

Cette étude ne peut pas se faire sur des patients car elle nécessite des prélèvements volumineux de tissus cornéens. Le remplacement de l'utilisation des animaux de laboratoire par des méthodes alternatives non animales n'est donc pas possible. Une réduction maximum au nombre d'animaux nécessaires est prévue afin d'obtenir des résultats concluants et ne nécessitant pas une double utilisation des procédures.

De plus, cette technique d'instillation d'antibiotique n'est pas encore reconnue par les autorités sanitaires. Elle ne saurait être d'emblée substituée au « gold standard » que sont les instillations horaires de collyres antibiotiques directement sur la surface oculaire.

Cette nouvelle technique doit donc d'abord être validée sur des cobayes animaux en évaluant la pénétration oculaire et la tolérance sur la surface de l'œil. Par la suite, ce dispositif de délivrance des antibiotiques pourra être utilisé chez des patients lors d'une étude clinique. Cette étude est en projet dans notre équipe et sera réalisée si cette technique apporte satisfaction.

L'étude consiste en la pose de verres scléraux adaptés aux yeux des lapins avec de l'ofloxacin en collyre non conservé dans le réservoir du verre. On étudiera la tolérance oculaire par l'observation en bio-microscopie du segment antérieur et des paupières chez dix lapins blancs de Nouvelle-Zélande. En outre, les concentrations d'ofloxacin intraoculaires (cornéenne, humeur aqueuse et vitrée) seront recherchées par Chromatographie-Liquide-Haute-Performance (CLHP). Différentes concentrations d'ofloxacin seront testées afin d'évaluer la dose maximale tolérée et de comparer les concentrations obtenues.

Cette étude sera réalisée par du personnel compétent, suivant les préconisations du suivi du bien-être des animaux. Une habitude à chaque manipulation est suivie pendant un minimum d'une semaine et le confort et bien-être sont surveillés au moins bi-quotidiennement par le personnel de soins. Des sorties au parc d'exercice sont prévues quotidiennement afin de suivre l'état général des animaux dans la volonté de raffinement des conditions d'utilisation de ces animaux. Même si la procédure suivie n'apporte pas d'inconfort (d'après les études menées chez l'homme aux USA) des mesures de raffinement complémentaires sont prévues (utilisation des antalgiques et analgésiques avant que toute souffrance ou angoisse puisse apparaître).

5406. Le cancer de la prostate, deuxième cause de décès par cancer chez l'homme, est une maladie hétérogène. Les outils diagnostiques actuels ne permettent pas d'identifier de façon précoce et fiable les patients qui développeront des tumeurs agressives et métastatiques. De surcroît, il n'existe pas de traitement ciblant de manière efficace les tumeurs métastatiques à l'origine du décès des patients. Afin d'améliorer les outils diagnostiques et de développer des approches thérapeutiques plus efficaces, une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires et cellulaires du développement tumoral est donc requise.

L'objectif du projet est le suivi et la caractérisation de ces tumeurs afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs, de nouvelles cibles thérapeutiques pour permettre aux industries pharmaceutiques de développer des molécules agissant à des stades précis du développement tumoral.

REPLACEMENT: Une stratégie privilégiée pour l'étude du cancer est l'utilisation de modèles animaux mimant le plus fidèlement possible la maladie humaine, les modèles cellulaires *in vitro* n'étant pas suffisants à la reproduction de la complexité biologique du cancer. Le laboratoire travaille sur des modèles génétiques murins permettant la génération précise et ciblée de tumeurs prostatiques aux caractéristiques très proches de celles observées chez l'homme.

REDUCTION: De nombreuses études menées auparavant sur le cancer de la prostate et sur ces modèles en particulier ont mené à une bonne connaissance du modèle et de la méthodologie appropriée, permettant ainsi la mise en place d'expérimentations de qualité et raffinées sur un nombre limité de cohortes, et la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum. Ainsi, ce projet sur cinq ans requiert un nombre total de 1800 animaux.

RAFFINEMENT: L'évolution est suivie pendant un délai suffisant à l'apparition de métastases (os, foie, poumon etc.), permettant ainsi l'étude des mécanismes d'apparition des formes les plus agressives et létales du cancer de la prostate. Néanmoins, une attention particulière sera accordée aux animaux tout au long de leur vie avec la mise en place de mesures antalgiques appropriées, et les expérimentations seront soumises à des critères précis d'interruption, afin de veiller à ce que chaque animal évolue dans les meilleures conditions qui soient, et sans souffrance.

5407. En France, chaque année plus de 300 000 personnes déclarent un cancer. Parmi eux, le cancer du poumon est la première cause de mortalité chez l'homme. Dans ce contexte, notre institut en collaboration avec un laboratoire extérieur souhaite développer de nouveaux modèles pour ce cancer. Les modèles de souris transgéniques de cancer sont l'un des principaux outils utilisés dans l'étude du cancer, par les institutions académiques et l'industrie, à travers le monde. La contribution de ces modèles animaux pour la compréhension des processus biologiques fondamentaux, à la recherche sur le cancer et le développement de médicaments, a été énorme par le passé et reste actuellement indispensable, les techniques *in vitro* ne permettant pas ce remplacer à ce jour les modèles vivants.

Ici, notre projet fera appel à des méthodes d'inactivation ciblée de gènes qui devraient permettre de développer des modèles encore plus proches de l'Homme. Le projet a pour objectif d'étudier le rôle du gène *Gprc5a* dans les cancers pulmonaires. Ce projet se déroulera en 2 étapes :

- L'activation du développement de ces cancers par l'inactivation locale de gènes d'une part et par l'exposition à de la fumée de cigarette d'autre part.

- L'étude et le suivi de ces cancers se fera notamment par échographie, technique non invasive.

Remplacement: Cette approche a pour objectif d'évaluer le rôle du gène *Gprc5a* dans le développement des cancers par l'utilisation de vecteurs spécifiques; ce qui nécessite l'utilisation d'expériences *in vivo* et ne peut donc pas être remplacée par des expériences *in vitro*.

Réduction: L'effectif d'animaux sera réduit au minimum indispensable. Il faudra un maximum de 160 souris sur toute la durée du projet.

Raffinement: De plus, afin de réduire tout stress ou souffrance, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et le développement des cancers fera l'objet d'un suivi très proche. Des points limites éthiques seront établis afin d'arrêter les procédures en cas de douleur difficile à traiter à l'aide d'antidouleurs ou si le cancer devenait trop avancé.

Cette étude permettra d'étudier de façon plus extensive le rôle du gène *GPRC5a* dans le développement de cancers et d'élaborer des outils permettant l'étude d'hypothèses thérapeutiques.

5408. La lésion médullaire acquise est le plus souvent d'origine traumatique, mais aussi ischémique, tumorale, ou inflammatoire. Outre la paraplégie ou la tétraplégie qui en découlent, les patients souffrent également de déficiences multi-systèmes, et notamment végétatives. Les deux principales atteintes végétatives sont d'ordre neuro-urologique et digestif.

La physiopathologie de l'atteinte digestive et anorectale de ces patients a été bien comprise en ce qui concerne les défauts d'innervation extrinsèque. En revanche l'atteinte du système nerveux entérique qui constitue l'innervation intrinsèque du tube digestif, a peu été explorée. En pratique clinique les troubles digestifs et anorectaux des blessés médullaires restent très difficiles à traiter, et nous avons besoin de mieux comprendre cette physiopathologie dans un modèle animal *in vivo*.

Nous proposons dans l'avenir d'étudier le remodelage du système nerveux entérique dans un modèle de rat spinalisé en T8. Ces rats seront obligatoirement traités par antibiotiques à large spectre urinaire pour éviter leur décès précoce par infection urinaire. En effet, ils ne pourront pas vidanger leur vessie correctement à cause de l'atteinte de la moelle épinière et seront automatiquement infectés au niveau vésical.

Avant de passer à ce modèle, il faut rechercher l'impact de l'antibiothérapie en termes de temps de transit, sur des expériences de motricité et également sur le remodelage neuronal et glial entérique.

Dans un premier temps nous proposons donc en tenant compte du principe des 3R - limitation des effectifs (2 expériences de 2 groupes de 10 animaux), raffinement des conditions d'hébergement des rats (enrichissement par ajout de frisottis, de roues), suivi quotidien afin d'éviter ou de détecter tout signe de souffrance ou de douleur, utilisation de moyens antalgiques - de comparer deux groupes de rats (non spinalisés) :

-un groupe contrôle

-un groupe traité par bi-antibiothérapie large spectre à visée urinaire.

Pour atteindre notre objectif scientifique, un modèle animal vivant est indispensable.

Les résultats préliminaires que nous obtiendrons sur la motricité colique, le temps de transit, et les résultats d'immunohistochimie, Western Blot et qPCR, nous permettront de déterminer l'impact de l'antibiothérapie s'il y en a un, et de pouvoir interpréter correctement les résultats de futures études menées de façon identique sur des modèles de rats spinalisés.

Les expériences seront reproduites 2 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera 40 animaux maximum.

5409. Ce projet concerne une étude sur les effets préventifs de la L-Citrulline sur la perte de la masse musculaire. La L-Citrulline est un acide aminé non protéinogénique qui entre dans la synthèse endogène de l'arginine. Elle est présente en quantité dans la pastèque et d'autres cucurbitacées. Cette étude chez la souris permettra de conforter les résultats positifs obtenus précédemment pour le traitement de la sarcopénie (diminution de masse, de force et de fonction musculaire liée à l'âge) chez le rat en vue d'une étude préclinique chez l'homme.

De nombreuses situations mènent à un déconditionnement musculaire important telles que l'immobilisation, le vieillissement, un style de vie sédentaire, la microgravité ou encore certaines maladies chroniques. Ce déconditionnement se caractérise par une perte de masse et des changements métaboliques du tissu musculaire ainsi que par l'apparition d'infiltrations graisseuses limitant, in fine, la fonction musculaire. Notre étude, à la fois fondamentale et appliquée, a pour but de caractériser d'une part les mécanismes impliqués dans ce déconditionnement musculaire et d'autre part de vérifier dans quelle mesure la nutrition, au travers de la supplémentation en L-Citrulline, peut le limiter.

Pour cela, nous avons besoin de procédures expérimentales permettant de :

1) simuler les effets de l'hypoactivité afin d'induire un déconditionnement musculaire, par suspension du train arrière dans un système de cages permettant de conserver la mobilité de l'animal,

2) étudier l'impact d'une supplémentation en L-Citrulline par gavage sur la limitation de la fonte musculaire en réponse au déconditionnement,

3) mesurer la synthèse protéique dans les muscles des animaux après la première procédure expérimentale.

Ces différents protocoles seront réalisés sur des souris sauvages C57BL/6J (10 animaux par lot). Un premier test impliquant seulement 30 animaux nous permettra de déterminer si nous poursuivons l'étude. Nous estimons qu'au maximum 120 animaux seront nécessaires pour mener à bien le projet sur 2 ans.

Les animaux seront hébergés individuellement en cages ouvertes T2 transparentes avec pour enrichissement des carrés de ouate (nourriture standard A04, Safe). Nous effectuerons au minimum deux visites de surveillance par jour, y compris les week-ends. Une pièce d'élevage sera dédiée à ce protocole et nous maintiendrons la température entre 22 et 23°C pour limiter le refroidissement des animaux lié à l'immobilisation partielle.

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

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaire. Les expérimentations animales avec système physiologique intégré sont donc indispensables. Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte ou de gain de la masse musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers le modèle animal se rapprochant le plus de l'humain sur la physiologie musculaire et avons donc choisi la souris. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'abandon de certaines souris dans l'expérimentation. Nos premiers tests réalisés sur 30 souris nous permettront de valider l'effet de la L-Citrulline. Si celui-ci n'est pas concluant, nous ne poursuivrons pas l'étude. Le

groupe contrôle sans procédure de suspension ni supplémentation ne sera réalisé que dans le cas d'un effet avéré de la L-Citrulline. Nous réaliserons les principales analyses sur le muscle soléaire, muscle postural lent avec une composition homogène en fibres (moins de variabilité inter-individus). L'intérêt de ce muscle chez la souris est sa petite taille (environ 7-10 mg) et nécessite donc une durée de suspension plus courte pour observer un effet d'atrophie.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") : Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux avec la mise en place de mesures antalgiques appropriées. Les suivis quotidiens des animaux permettent d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation, etc. Le report quotidien des poids corporels sera un paramètre intégré à nos protocoles. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

5410. La rétinopathie diabétique (RD) est la principale cause de cécité irréversible acquise dans la population en âge de travailler. Plus d'un diabétique de type 2 sur 2 développera une RD après 20 ans de diabète.

Il existe deux formes de RD : la RD non proliférative (RDNP) et la RD proliférative (RDP) mais les causes précises du développement et l'évolution vers l'une de ces formes chez le patient ne sont pas connues. La RDNP se caractérise essentiellement par une dégénérescence rétinienne responsable de la perte de vision irréversible. La RDP correspond à l'apparition de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau de la rétine qui, à terme, peuvent provoquer des hémorragies et accélérer l'évolution vers la cécité. Les traitements existants permettent seulement de ralentir l'évolution de la RDP. Aujourd'hui, une meilleure compréhension des mécanismes menant au développement et à l'évolution vers l'une ou de l'autre forme de la RD est nécessaire afin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de prévenir au mieux l'évolution de la maladie.

Les patients diabétiques ont une proportion élevée de monocytes circulants inflammatoires. Ces monocytes pourraient jouer un rôle important dans le développement de la maladie. En effet, il a été montré que dans le contexte rétinien, les monocytes et leurs dérivés pouvaient avoir un effet pro-angiogénique (favorisant l'apparition de nouveaux vaisseaux) ou au contraire un effet anti-angiogénique.

Des études préliminaires ont pu montrer que le taux de transcription de cytokine pro-inflammatoire CCL2 était plus élevé chez les patients souffrant d'une RDNP et que le taux de transcription du facteur de croissance vasculaire (VEGF) était plus élevé à la fois chez les patients souffrant de RDNP et de RDP comparés aux patients diabétiques sans RD.

L'augmentation de l'expression de cytokines spécifiques chez certains patients diabétiques semble être le résultat d'interactions complexes entre les cellules inflammatoires, vasculaires et neuronales de la rétine et les cellules inflammatoires de la circulation sanguine, de la moelle osseuse et de la rate soumises à une hyperglycémie. Ces interactions complexes ne peuvent être modélisées in vitro, ainsi l'utilisation d'un modèle de souris pour lequel il est aisé de contrôler le diabète nous est nécessaire.

Afin de répondre à l'ensemble des interrogations sur l'implication des différents types cellulaires impliqués dans la production des cytokines favorisant l'évolution vers l'une ou l'autre des formes de la maladie, nous estimons avoir besoin de 432 souris réparties dans les différentes procédures expérimentales.

Le principe de remplacement, de réduction et de raffinement, décrit au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R » sera respecté. L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude physiopathologique. Les procédures expérimentales seront regroupées dans la mesure du possible pour ne pas multiplier les pools d'animaux contrôles. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et par le personnel qualifié des animaleries. Des mesures antalgiques appropriées sont prévues. Les conditions d'hébergements seront adaptées au modèle expérimental, toutes les souris ont à disposition des nids en cellulose et des bâtons à ronger. Si nécessaire (exemple : agressivité des mâles), des maisonnettes en carton seront introduites dans les cages de stabulation. Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus.

5411. Toutes les projections prévoient un doublement de la consommation alimentaire mondiale dans les 20 prochaines années. En même temps, la tendance à une consommation forte de protéines animales se généralise. Elle est incompatible avec les ressources disponibles et les enjeux environnementaux de durabilité des systèmes agricoles. Il est donc nécessaire de développer des produits alimentaires attractifs à base de protéines végétales tout en assurant une production des matières premières protéiques respectant le plus possible l'environnement. La plupart des sources de protéines végétales présente une composition en acides aminés déséquilibrée, en général carencée en lysine dans le cas des céréales ou en acides aminés soufrés pour les protéagineux. Néanmoins, en exploitant la complémentarité des profils d'acides aminés de plusieurs sources, il est possible de produire des mélanges présentant un profil en acides aminés suffisamment diversifié pour permettre de compenser la diminution indispensable des apports en protéine animales tout en assurant aux consommateurs un bon équilibre. Les filières de valorisation des légumineuses en alimentation humaine sont peu développées en France. Lentilles, haricots secs et pois sont globalement très peu consommés du fait de leur préparation culinaire un peu longue et des problèmes de digestibilité qu'elles provoquent. Pourtant du fait de leur profil en acides aminés, ces légumineuses bénéficient d'atouts nutritionnels qui mériteraient d'être mis en valeur notamment en mélange avec d'autres matières premières végétales. Ainsi les mélanges céréales / légumineuses constituent une option prometteuse à la fois au plan nutritionnel et au plan cultural. Depuis quelques années, les recherches visant à développer des pratiques agricoles soutenables se sont tournées vers les cultures associées de légumineuse / blé qui permettent de limiter les intrants tant au plan des engrais azotés que des produits phytosanitaires. La culture blé/légumineuse associée au champ est vraiment prometteuse du point de vue environnemental. Son développement est aujourd'hui largement limité par les débouchés insuffisants et les revenus trop faibles apportés par les cultures de légumineuses. Développer des produits contenant des

légumineuses pour l'alimentation humaine sans démultiplier les étapes de transformation permettrait d'augmenter la valeur ajoutée de ces matières premières. Ce projet s'intéresse aux mélanges légumineuses / blé utilisés dans des proportions réalistes par rapport à celles qui resteraient présentes après un tri grossier en sortie de champ (5 à 10% de légumineuses dans le mélange de farine légumineuses/blé résultant) mais également plus élevée (20 à 40% de légumineuses dans le mélange de farine légumineuses/blé résultant) pour permettre un meilleur équilibre du profil en acides aminés pour compenser le manque de lysine dans les céréales. Une légumineuse parmi celles qui contiennent une forte proportion de protéine (lentille, lupin, féverole, pois protéagineux,...) a été sélectionnée. Le produit de cette étude sera un produit transformé pour une large consommation en Europe que nous ne pouvons décrire pour des raisons de confidentialité.

Nous souhaitons mettre en place un protocole utilisant des rats mâles Wistar jeunes afin d'évaluer l'impact de l'introduction de différents mélanges blé/légumineuse dans un produit transformé sur la biodisponibilité en acides aminés et leur assimilation par des rats jeunes en croissance.

Cette étude permettra de tester l'efficacité alimentaire, la digestibilité, l'utilisation protéique, la rétention protéique et le taux de croissance de rats jeunes (1 mois), consommant ces aliments durant 21 jours. 3 formulations différentes seront comparées à un régime témoin (6% de lipides, 77% de glucides et 17% de protéines sous forme de caséine), et à un régime sans protéines (pour mesurer les pertes azotées endogènes). Ces rats seront séparés en 5 groupes de 12 rats chacun, soit 60 rats. Les produits transformés issus des 3 formulations et le régime témoin seront fabriqués de telle façon que la consommation en azote quotidienne soit identique entre les groupes de rats.

L'ensemble du projet comporte 4 procédures expérimentales dont le degré de gravité va de « léger » pour 3 d'entre elles à « sans réveil » pour la dernière. Un maximum de mesures seront prises afin de respecter la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner). Ainsi, les paramètres mesurés dans ce projet (efficacité alimentaire, digestibilité...) ne permettent pas l'utilisation d'un modèle cellulaire. Le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum et limité à 12 tout en permettant d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante. Des mesures antalgiques et des points-limites précis sont proposés pour réduire la souffrance des animaux s'il y a lieu.

5412. Nous avons développé un projet de thérapie génique du cancer en combinant un gène suicide optimisé (breveté) et du cyclophosphamide (CPA). Le CPA est une prodrogue qui est métabolisée par le gène suicide optimisé en phosphoramidate moutarde (anticancéreux) et en acroléine (composé toxique). En clinique humaine, pour éviter les toxicités dues à l'acroléine, le CPA est toujours administré en association avec du MESNA (UROMITEXAN ND) pour détoxifier l'acroléine sans modifier les propriétés anticancéreuses de la phosphoramidate moutarde.

Les métabolites du CPA sont connus pour avoir une toxicité sur différents organes et l'évaluation de la dose pouvant être administrée aux animaux sans conséquences cliniques inacceptables est nécessaire avant d'en évaluer l'efficacité.

Il est donc essentiel pour pouvoir développer un modèle préclinique chez le lapin avec un hépatocarcinome (modèle prévu avec une société pharmaceutique intéressée par notre stratégie thérapeutique qui fera l'objet d'un projet ultérieur), de s'assurer au préalable de la bonne dose de CPA et de MESNA à utiliser. Nous voudrions tester 3 doses de CPA administrées en intraveineuse avec du MESNA à raison de 4 lapins/groupe. Un groupe témoin sans traitement et 3 groupes traités, soit 16 lapins. Ce nombre de 4 animaux par groupe est le strict minimum envisageable pour que les résultats soient prédictifs.

Le cyclophosphamide et le MESNA seront administrés en intraveineuse dans l'oreille des lapins selon les préconisations du fabricant (Baxter). On procédera à 2 injections à 1 semaine d'intervalle.

L'ajustement de la dose doit être réalisé dans l'espèce animale où l'efficacité sera testée, ici le lapin et cette escalade de dose ne peut pas être remplacée par des essais sur des modèles cellulaires ou inertes. La surveillance clinique sera quotidienne et le suivi des paramètres biologiques plasmatiques sera réalisé deux fois par semaine. Des mesures antalgiques appropriées sont prévues. Les animaux chez qui une toxicité sera détectée dont l'intensité rendrait impossible l'usage du CPA à la dose testée feront l'objet d'une euthanasie.

5413. Les anticorps jouent un rôle crucial dans les mécanismes de défense de l'organisme et sont exclusivement produits par une population cellulaire spécifique : les cellules ou lymphocytes B. Les anticorps produits par les cellules B tout au long de la vie d'un individu sont extrêmement diversifiés. Cette diversité est générée par des processus qui se produisent au niveau des gènes responsables de la production des anticorps. Ces gènes sont en effet morcelés et doivent subir un assemblage de différents segments avant que la cellule puisse produire un anticorps donné. Cet assemblage implique des cassures au niveau de l'ADN de ces gènes. Ces cassures sont tout à fait physiologiques et sont normalement réparées avec une grande efficacité. Cependant, dans certains contextes qui sont encore mal compris, ces cassures peuvent être détournées vers des translocations chromosomiques : ce sont des cassures au niveau de chromosomes différents suivies d'un échange réciproque entre des parties des deux chromosomes partenaires. Les mécanismes moléculaires qui initient les cassures sur les deux chromosomes partenaires sont encore obscurs.

Notre projet comporte deux volets : l'aspect fondamental concerne la compréhension des mécanismes à la base de la diversification des anticorps ; l'aspect biomédical a pour objectif de préciser dans quel contexte les translocations chromosomiques impliquant les gènes des anticorps sont initiées.

Dans cet objectif, nous utilisons pour l'essentiel des modèles murins dans lesquels des mutations ont été introduites à différents sites des gènes des anticorps. Les lignées utilisées nous servent principalement de source de matériel biologique (cellules B purifiées de différents tissus lymphoïdes, acides nucléiques) pour l'analyse de l'expression des gènes des anticorps ou pour induire *ex vivo*, dans des systèmes de culture cellulaire spécifiques, les translocations chromosomiques. Cependant, les translocations sont

des événements rares, ce qui rend leur étude compliquée. Pour contourner ce problème, nous utilisons, grâce à des croisements appropriés, un fond génétique déficient en la protéine p53 qui permet d'« amplifier » les translocations.

Les mutations dans les gènes des anticorps n'induisent pas de douleur décelable ou de gêne particulière. Elles n'induisent pas non plus de tumeur, à l'exception de la lignée déficiente en p53 dont nous nous servons ponctuellement et qui peut développer un lymphome. Dans ce cas précis, nous adoptons en plus des critères généraux d'arrêt (points limite) par rapport à la souffrance (arrêt d'alimentation, amaigrissement, poil hérissé, prostration durable) un critère lié à la taille de la tumeur (< 5 mm).

Dans de rares cas, nous recourons à une immunisation qui est effectuée sur une durée de 28 jours sans addition d'adjuvant. Dans des cas très précis où l'addition de l'adjuvant de Freund se révèle nécessaire, nous utilisons un antalgique (Temgesic). La prise de sang se fait sous anesthésie.

Dans tous les cas, le suivi est quotidien pour s'assurer du bien-être des animaux, pour suivre l'évolution de la taille de la tumeur et l'apparition de signes éventuels liés à l'aspect de la tumeur ou à la souffrance des souris (amaigrissement, prostration, gêne dans les mouvements, etc.).

La procédure impliquant p53 nécessite 54 souris : 3 souris sauvages et 3 souris p53 (comme contrôles), 3 souris de chacun des deux mutants et 3 souris de chacun des deux mutants dans le fond p53. Dans chaque expérience, nous utilisons 3 souris de chaque génotype afin de pallier aux variations (de souris à souris). Chaque expérience est répétée 3 fois pour des besoins statistiques et de reproductibilité. Dans tous les cas, les souris âgées de 6 semaines sont euthanasiées et leurs organes (moelle osseuse et rate) sont récupérés pour cultiver les cellules *in vitro* et en extraire les acides nucléiques.

La procédure impliquant l'immunisation nécessite 54 souris : 3 lots de 6 souris de chacun des 3 génotypes (souris sauvages et 2 mutants). A J0 et J14, chaque lot est immunisé par injection intrapéritonéale de tampon PBS, d'ovalbumine (antigène T-dépendant) ou de TNP-Ficoll (antigène T-indépendant). Les prises de sang sont effectuées aux jours J0, J14 et J28. L'expérience est arrêtée à J28 où les souris sont euthanasiées au CO2. L'expérience d'immunisation est réalisée une seule fois.

Dans toute notre démarche, de l'hébergement des souris à l'expérimentation, nous nous faisons un devoir de respecter la règle des 3R. En étroite interaction avec les animalier(e)s, le nombre des souris est réduit au strict nécessaire permettant de réaliser 3 expériences indépendantes (projet p53) pour s'assurer de la reproductibilité des résultats. Le raffinement inclut d'un côté les conditions d'élevage et d'hébergement qui sont optimisées par les animalier(e)s (nombre de souris ne dépassant pas 5/cage, inclusion de différents objets dans les cages, etc.), et d'un autre côté le choix des méthodologies induisant le moins de souffrance et la mise en œuvre de mesures antalgiques. Notre souci premier dans ce contexte est la prévention de souffrances inutiles.

La nature des travaux que nous menons, et qui concernent la physiologie et le développement des lymphocytes B, impose le choix de la souris dans la mesure où sa génétique est bien connue. En effet, les processus développementaux que nous étudions ne peuvent être abordés dans leur complexité physiologique (développement, interactions avec d'autres molécules et cellules, vieillissement, etc.) dans des lignées cellulaires ou d'autres systèmes *in vitro*. Néanmoins, aussi souvent que possible, dans le respect du principe de remplacement, nous utilisons des lignées cellulaires ou d'autres systèmes de culture cellulaire. Enfin, notre démarche inclut également la responsabilisation de tous les membres de l'équipe amenés à faire de l'expérimentation animale grâce notamment à des formations spécifiques et au respect des règles en vigueur.

5414. Si les caractéristiques cliniques de l'état de stress post-traumatique (ESPT) sont bien décrites, les bases neurobiologiques de cette pathologie sont encore méconnues. L'un des traits cardinaux de cette pathologie, se développant à la suite d'un événement de stress intense, est une altération mnésique paradoxale associant à la fois une amnésie et une hypermnésie. S'il est connu qu'un épisode de stress et que la formation d'une mémoire peuvent s'accompagner de phénomènes de plasticité cellulaire (modifications de la morphologie cellulaire et des épines dendritiques, altération de la neurogénèse adulte) et synaptique, notamment au sein du réseau hippocampo-amygdalien, les effets différentiels de deux types de mémoires sur ces phénomènes restent méconnus. Ce projet a pour objectif de déterminer dans quelle mesure certaines de ces altérations du réseau hippocampo-amygdalien peuvent être spécifiquement associées au passage d'une mémoire émotionnelle normale à une mémoire de type post-traumatique. Ainsi, en identifiant les bases neurobiologiques spécifiques de la mémoire traumatique, ce projet doit ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour le traitement de ce trouble lié au stress.

Une telle investigation implique l'utilisation d'un modèle permettant de distinguer et de comparer après un épisode de stress le développement d'une forme de mémoire émotionnelle normale et d'une mémoire de type ESPT. Le modèle de mémoire traumatique développé récemment au sein de l'équipe permet précisément une telle comparaison. Dans un souci de respect du R de réduire, nous utiliserons au maximum 1040 souris issues d'un centre d'élevage agréé sur 5 ans pour ce projet, ce qui nous permettra de limiter la variation interindividuelle et de pouvoir avoir tous les groupes contrôles nécessaires. Dans le respect du R de raffiner, toutes les douleurs seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. L'utilisation de ces animaux se justifie (R du remplacement) pour plusieurs raisons :

- 1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'étudier les processus mnésiques.
- 2) L'organisation du système nerveux central des rongeurs est assez proche de celle de l'Homme, ce qui permet une extrapolation acceptable des résultats obtenus chez ces espèces à l'espèce humaine.
- 3) Le modèle comportemental a été établi chez la souris et les appareils comportementaux sont dimensionnés pour cette espèce.

La réalisation des expériences sera confiée à des utilisateurs expérimentés. Le présent dossier démontre par la suite la conformité des expérimentations envisagées qui se feront en complète adéquation avec la réglementation.

5415. Notre processus de production assure la production d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par un immunogène. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique. Il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines, des peptides, des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun leur spécificité, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou engendrant une structure épitopique conformationnelle. A la différence des anticorps polyclonaux, qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un anticorps monoclonal est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte cloné, puis copié en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoléctromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

L'approche envisagée pour l'obtention d'AcM se base sur la technique d'hybridation cellulaire développée par Cesar Milstein et Georges Köhler, pour laquelle ils ont obtenu le prix Nobel Médecine et Physiologie en 1984. Son principe repose sur deux étapes principales, à savoir :

- injection d'une protéine d'intérêt (antigène) à des souris, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps dirigés contre cette molécule qui est reconnue par le modèle murin comme du « non-soi ».
- les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à des cellules immortelles de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire *in vitro* des anticorps. Ainsi, chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental et de manière durable.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car le génome des souris présente environ 95% d'homologie avec celui de l'homme. De plus, les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 500 souris.

La période minimum d'immunisation des souris est de 44 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modéré. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation. Des mesures antalgiques appropriées seront mises en place si nécessaire. Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

5416. Le développement et la validation réglementaire des dispositifs visant à la réparation / remplacement des tissus musculo squelettiques requiert une phase de recherche préclinique qui permet leur mise au point et la validation de leur efficacité et sécurité avant d'être implantés chez l'homme. Le traitement des affections musculo-squelettiques s'est considérablement développé au cours du XXème siècle avec l'avènement de dispositifs d'ostéosynthèse par exemple, permettant dorénavant de réparer les fractures par exemple en restituant *ad integrum* la fonction des organes atteints avec une bonne résistance mécanique au cours de la cicatrisation. La limite de ces techniques est par exemple la disponibilité de tissus de substitution lors de perte tissulaire importante ou l'invasivité des techniques opératoires. Il est dès lors nécessaire de s'appliquer à réduire le trauma du geste chirurgical et trouver des tissus de substitution. A l'heure actuelle pour un patient nécessitant une greffe de tissu il est souvent soumis d'abord à un premier prélèvement pour obtenir le greffon sur un site sain (douleur et traumatisme pour le patient sur un site sain) puis ce greffon autologue est utilisé dans le traitement du site atteint (trauma pour l'abord du site atteint). C'est dans ce cadre par exemple que le développement de nouveaux dispositifs de synthèse est nécessaire tout en s'appliquant à développer des techniques de moins en moins invasives, avec l'aide de l'imagerie pour naviguer dans l'organisme en réduisant les ouvertures ou

utiliser des techniques de cathétérisme, pour injecter des substances actives dans la réparation. Les modèles animaux utilisés dans ce projet suivront un parcours médical équivalent à celui d'un patient avec les mêmes exigences de suivi, dans un environnement avec un plateau technique et des personnels de pointe. Le suivi permettra de valider la bonne évolution des dispositifs implantés et donc la poursuite des implantations mais aussi le suivi constant de la bonne santé et du confort des modèles animaux. Ces modèles seront des modèles de grands animaux, dont l'anatomie ressemble en taille et forme à celle de l'homme. Sur 5 ans ce projet requiert environ 300 implantations, sur des ovins (n= 150) sur des porcins (n= 100) sur des canins (n= 50). Ce projet permettra la validation des prototypes et les tests réglementaires démontrant le bon fonctionnement des dispositifs et l'absence d'effets secondaires critiques sur l'ensemble de l'organisme, c'est donc l'étape indispensable pour assurer la sécurité des patients. Pour réduire le nombre d'animaux, des sélections par méthodes d'imagerie peu invasives pourront être mises en place (IRM, Scanner, RX etc.), permettant par exemple une reconstruction 3D. Tous les tests seront réalisés sous anesthésie générale pour réduire la contrainte sur les animaux et une analgésie multimodale, locale et générale, (morphiniques systématiques) permettront de procurer le confort post-opératoire aux animaux. L'objectif de ce projet est donc le développement des nouveaux dispositifs et techniques de traitement des affections musculo-squelettiques avec diminution du traumatisme sur l'organisme.

5417. Le projet de l'équipe est basé sur l'étude des mécanismes qui causent de l'autisme et des déficiences intellectuelles associées à des changements du nombre de copies dans le matériel génétique humain. L'objectif ultime est de développer des stratégies thérapeutiques pour aider à améliorer les capacités cognitives des patients. Ces maladies rares induisent des pertes d'autonomie importante avec des conséquences pour les familles et la société.

Nous nous intéressons particulièrement au syndrome associé à une déficience intellectuelle correspondant à la perte d'une copie de la région génétique située sur le chromosome 16 (région p11.2, noté « 16p11.2 ») comprenant une trentaine de gènes. La variabilité symptomatique de ce type de syndromes chez l'homme rend son étude très difficile. Par ses similitudes du point de vue génétique, physiologique et moléculaire, la souris constitue un modèle de choix pour l'étude des relations entre la présence ou l'absence de gènes et l'apparition d'un caractère phénotypique, un modèle animal étant indispensable (REMPLACEMENT).

Nous avons généré *in vitro* le modèle murin porteur de cette altération génétique dans la région homologue du génome humain et nous avons trouvé *in vivo* des défauts dans l'activité circadienne, la reconnaissance d'objet et la mémoire associative des souris mâles porteurs de la délétion de la région homologue. Ces atteintes ressemblent aux défauts observés chez les patients et nous ont permis de définir une batterie de tests comportementaux.

Dans ce nouveau projet nous voulons tout d'abord déterminer si les mêmes défauts sont observés chez les femelles souris porteuses de cette modification génétique en utilisant la même série de tests comportementaux.

Ensuite nous voulons compléter cette étude en se basant sur l'identification d'une famille dont les membres sur trois générations présentent de l'autisme et dans laquelle cinq gènes de la région 16p11.2 sont présents qu'en une seule copie. Nous avons prévu l'étude comportementale d'un modèle murin pour chacun des 5 gènes et l'étude d'un modèle portant une perte des 5 gènes avec la même série de tests comportementaux.

Enfin les études réalisées jusqu'à présent laissent entrevoir une piste d'intervention avec une drogue que nous avons déjà utilisée dans d'autres modèles murins de déficience intellectuelle. Nous avons donc prévu un protocole basé sur la série de tests comportementaux pour déterminer si cette drogue administrée par voie orale pouvait restaurer des capacités cognitives dans le modèle souris porteur de la délétion de la région homologue au 16p11.2.

Afin de suivre la règle des 3R, et en particulier la REDUCTION, nous avons réduit le nombre d'animaux (330 au total) pour ces 8 études en utilisant des protocoles optimisés tout en gardant un nombre d'animaux suffisant pour une bonne analyse statistique des résultats en fonction de la puissance de nos tests. Le RAFFINEMENT des expériences va permettre d'éviter au maximum le stress des souris. L'ensemble des tests comportementaux n'entraîne pas de stress ou souffrance sévère pour l'animal et les animaux feront l'objet d'un suivi permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. La souris demeure l'animal le plus proche de l'homme comme modèle de maladies génétiques humaines. Cette étude sur les animaux est nécessaire pour déboucher potentiellement sur la compréhension de cette maladie et un nouveau traitement pour cette maladie rare.

5418. 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 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 réduirons 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 les réglementations 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).

5419. L'hyperkaliémie est un trouble électrolytique qui peut causer de sévères altérations des fonctions cardiovasculaires. Sa prévalence dans la population des insuffisants rénaux est particulièrement élevée (40%) comparée à la population générale (1% – 2%). Ceci s'explique par le fait que l'insuffisant rénal ne peut excréter correctement la charge en potassium qu'il ingère quotidiennement. Face à cette difficulté, l'organisme tente de s'adapter en augmentant son excrétion par voie intestinale. C'est aussi sur ce principe que sont basées certaines approches thérapeutiques visant à diminuer la kaliémie en capturant le K⁺ par une résine cationique non-assimilable. Cependant, l'efficacité et l'innocuité de ces composés semblent aujourd'hui remises en question.

Face à cette problématique, nous proposons de poursuivre deux objectifs :

- élucider de façon précise les mécanismes de la régulation du bilan potassique.
- apporter la preuve de concept que l'inhibition de la réabsorption de K⁺ par la H, K-ATPase de type 2 (HKA2) exprimée dans le colon peut contribuer à normaliser la kaliémie au cours de l'insuffisance rénale.

Pour ce faire, une insuffisance chronique par néphrectomie subtotale sera établie chez des souris normales (WT) et transgéniques, n'exprimant pas la HKA2 (HKA2 KO) et leurs paramètres métaboliques et rénaux seront analysés.

D'après notre expérience dans des modèles animaux proches de ce modèle et en se basant sur la littérature, nous aurons besoin d'un groupe de 12 souris par modèle murin (WT ou HKA2 KO) pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier les différents résultats (un total de 384 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans). Nos modèles de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact de l'insuffisance rénale sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier. De plus, dans le cadre d'une collaboration, nos résultats expérimentaux serviront à la validation d'un modèle mathématique prédictif de la régulation du potassium au cours de l'insuffisance rénale.

Les protocoles thérapeutiques de prise en charge de la douleur et les critères d'interruption d'expérimentation sont définis afin d'assurer le bien-être des animaux au cours de l'étude.

5420. Les Poly (ADP-ribose) polymérase (PARPs, une famille de 17 membres) sont des protéines impliquées dans la maintenance de l'intégrité du génome. PARP1 et PARP2 sont maintenant connues comme des acteurs clés de la réponse cellulaire aux dommages dans l'ADN. Leur inhibition présente un intérêt en thérapie du cancer en potentialisant l'action cytotoxique des agents anti-tumoraux. Les inhibiteurs actuellement en essai clinique sont toutefois peu spécifiques et l'un des objectifs en recherche est de décortiquer les propriétés fonctionnelles des autres membres de cette famille. Dans cette idée, nous avons récemment entrepris la caractérisation biochimique et fonctionnelle de PARP3 qui est moins connue. Nous avons notamment identifié un rôle de PARP3 dans la réponse cellulaire spécifiquement des cassures double-brins et dans la mitose. Nos données actuelles *in vitro* en utilisant des modèles cellulaires, révèlent un rôle clé de PARP3 dans la différenciation cellulaire de myoblastes en myotubes. Cet événement est notamment activé lors de la régénération musculaire du muscle blessé et met en jeu des cellules souches appelées cellules satellites chez l'adulte. Le projet soumis vise à valider cette observation et à confirmer le rôle de PARP3 *in vivo* en utilisant le modèle myotoxique nécrotique induit du muscle blessé chez la souris. Le protocole expérimental implique l'injection intramusculaire (IM) d'un myotoxique dans une patte de la souris, et l'injection IM d'une solution saline dans l'autre patte contrôle. A différents temps post-injection, les animaux sont euthanasiés, une biopsie des muscles est réalisée à proximité des zones d'injection. Ces biopsies sont ensuite traitées pour des analyses histologiques permettant de suivre la régénération musculaire, des analyses d'expression de protéines et/ou d'expression de gènes permettant de suivre des marqueurs connus de la régénération. Nous utiliserons 530 animaux pour la réalisation du projet. Nous appliquerons le test statistique paramétrique ANOVA en utilisant le logiciel R dans notre procédure et en considérant un minimum de 95% d'intervalle de confiance. Avec ce travail nous espérons définir PARP3 comme une protéine clé de la différenciation des cellules souches satellites et de la régénération musculaire.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : nos modèles de lignées cellulaires dans lesquels nous avons diminué ou éliminé l'expression de PARP3 se heurtent à leur limite de transposition dans des modèles intégrés pour l'étude de la différenciation des cellules musculaires. Les observations actuelles du laboratoire dans ces modèles *in vitro* permettent de proposer PARP3 comme une protéine clé de la régénération musculaire. Toutefois, la validation de ces résultats nécessite des approches *in vivo* ici chez la souris. L'approche que nous proposons est largement utilisée dans le domaine. Nous disposons des souris PARP3^{-/-} dans le laboratoire pour développer cette question.

Réduire : le nombre minimum d'animaux nécessaire à ces approches *in vivo* a été très précisément réfléchi. Les questions *in vivo* entreprises dans ce projet reposent sur des données *in vitro* déjà bien caractérisées. Il ne s'agit donc pas d'une étude exploratoire chez la souris mais de la validation *in vivo* d'un résultat existant. Le nombre d'animaux indiqué est calculé sur la base d'une

validation statistique. De plus, les réplicats de l'expérience de régénération du muscle ne seront effectués qu'après une analyse complète et la validation des résultats de la première expérience.

Raffiner : les injections intramusculaires du myotoxique sont réalisées sur des animaux anesthésiés. Les animaux seront surveillés et pesés quotidiennement en portant une attention particulière à des signes manifestes de douleur (animal prostré, ne se toilettant plus, ne se nourrissant plus, déshydraté). Dans ces cas, et si une perte de poids supérieure à 20% est observée, les animaux seront sacrifiés immédiatement (points limite). Si les signes cliniques sont légers à moyens, un traitement par un analgésique sera mis en place. Les animaux peuvent être maintenus en groupe et un enrichissement des cages sera mis en place.

5421. Le choc hémorragique est caractérisé par une perte brutale de sang qui compromet l'apport en nutriments et en oxygène aux organes. La cause d'hémorragie la plus fréquente et la plus grave est traumatique et touche des sujets jeunes, victimes d'accidents ou d'agressions. Le choc hémorragique crée des anomalies de la perfusion tissulaire au sein des organes et de fréquentes lésions cellulaires. La réanimation améliore la perfusion tissulaire, mais des lésions tissulaires persistent et contribuent au développement de défaillances d'organes. Au niveau des reins, ces lésions tissulaires sont à l'origine d'insuffisance rénale aiguë qui au cours du temps peuvent progresser vers l'insuffisance rénale chronique. Il est donc nécessaire de trouver des thérapeutiques pour prévenir et/ou traiter ces lésions.

Les Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) principalement issues de la moelle osseuse, sont de puissants modulateurs des réponses immunitaires et participent à la réparation des tissus lésés. Leur efficacité peut être optimisée en modulant l'environnement de culture des cellules, c'est le concept de "priming" cellulaire. La thérapie cellulaire apparaît comme une stratégie innovante particulièrement intéressante dans le traitement des lésions tissulaires post hémorragique.

L'objectif de cette étude *in vivo* est de valider et optimiser l'utilisation de la thérapie cellulaire par CSM sur l'apparition des altérations tissulaires dans un modèle de choc hémorragique réanimé chez le rat. En effet, les modèles animaux fournissent des informations fondamentales sur la pharmacocinétique, la toxicité, et le mécanisme d'action du traitement cellulaire qui ne peuvent pas être remplacés par d'autres méthodes.

Nous allons comparer l'efficacité des différents traitements, au cours du temps (2, 7 et 21 jours), sur la fonction rénale ainsi que sur les altérations tissulaires dans différents organes (rein, intestin, poumon, le foie ...).

Cette étude se présentera en deux phases : Une première phase de réalisation du modèle hémorragie/réanimation avec administration des traitements, suivie d'une seconde phase d'exploration rénale avec recueil d'échantillons sanguins, urinaires et tissulaires. Ces 2 phases, nécessitant la réalisation de gestes chirurgicaux, seront effectuées sous anesthésie générale avec analgésie. A l'issue de la 2ème phase l'ensemble des animaux sera mis à mort pour réaliser les prélèvements.

Un nombre de 648 rats Sprague Dawley mâles sont prévus pour ce projet. Notre étude sera réalisée par étapes successives avec prise de décision sur l'arrêt ou la poursuite du projet. 98 rats maximum permettront de déterminer le modèle pathologique et 550 rats maximum pour l'étude thérapeutique. Ces études chez l'animal demeurent essentielles pour l'exploration de nouvelles thérapies dans ce genre de contexte extrêmement complexe d'un point de vu physiopathologique, elles ne peuvent pas être remplacées uniquement par des modèles cellulaires. Elles fourniront des informations fondamentales sur la pharmacocinétique, la toxicité, et le mécanisme d'action du traitement qui ne peuvent pas être remplacés par d'autres méthodes. Cependant, en accord avec le principe de réduction nos expérimentations *in vivo* seront réalisées par étapes permettant d'éliminer au fur et à mesure des hypothèses non valables. Par ailleurs, seules les propositions thérapeutiques dont des effets bénéfiques auront été préalablement démontrés *in vitro* seront étudiées dans ce protocole.

Dans nos séries d'animaux, 8 rats seront inclus dans les groupes non pathologiques (contrôles et témoins) et de 10 à 14 rats inclus dans les lots pathologiques (traités et non traités). Si les critères d'inclusion (réussite du modèle pathologique et absence d'inflammation post-opératoire) sont remplis pour les 10 premiers animaux de chaque lot pathologique, nous n'utiliserons pas 140 rats sur les 648 initialement prévus. Par ailleurs si le modèle pathologique par hémorragie réanimation seule permet d'induire des altérations tissulaires rénales, alors 78 rats supplémentaires seront épargnés.

Enfin, concernant le raffinement, le confort et le respect du bien-être des animaux étant une de nos priorités, un soin constant sera porté pour assurer l'antalgie par injections de Buprénorphine. Nous veillerons également à l'apparition de signes d'inflammation ou d'infection, chez les animaux. Si une évolution défavorable de l'animal est constatée (infection/inflammation très importante des zones de sutures), l'animal sera mis à mort par surdose de gaz anesthésiant. Par ailleurs, certains animaux étant hébergés sur une longue période, nous enrichirons les cages avec des jouets.

5422. Ce projet permet de vérifier l'efficacité de candidats médicaments en utilisant des modèles de pharmacologie chez le rongeur, sur les acouphènes et la perte d'audition. La perte d'audition et les acouphènes sont deux indications pour lesquelles aucune solution thérapeutique satisfaisante n'existe à ce jour. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les déficiences auditives toucheraient aujourd'hui 15% de la population mondiale. L'impact sociétal est majeur, pouvant entraîner chez les malades, isolement social et dépression. La recherche de thérapies pour le traitement des désordres auditifs est très active, mais les expertises en matière de développement de médicaments incluant les modèles animaux et la mise en œuvre d'une recherche dite « translationnelle » font sévèrement défaut. C'est le contexte dans lequel s'inscrit ce projet qui consiste à générer chez le rongeur, au travers des mêmes causes que celles observées chez l'homme, des acouphènes et/ou une perte d'audition pour vérifier l'efficacité de principes actifs et permettre leur passage en phase expérimentale est limité aux seules expériences considérées comme indispensables pour démontrer l'efficacité d'un principe actif sur les acouphènes ou la perte d'audition. Toute expérimentation fait l'objet d'un calcul de N permettant de définir un nombre minimum d'animaux pour mesurer de manière statistiquement représentative une efficacité.

Le projet s'établit selon la règle des 3 R : Remplacer : L'analyse de l'état de l'art de la recherche préclinique dans l'audition montre que l'utilisation des modèles rongeurs est la seule alternative pour tester l'efficacité des principes actifs avant leur administration chez l'homme. Une veille technologique continue permet de rester vigilant sur l'arrivée de nouvelles techniques qui viendraient se substituer à l'expérimentation animale. Réduire : le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet est dépendant du nombre de candidats médicaments à tester par an. On l'estime à un maximum sur 5 ans de 5730 rats/cobayes et 480 souris. Raffiner : Les animaux sont pris en charge par des personnes ayant toutes les qualifications pour exercer dans le domaine de l'expérimentation animale. Ils font l'objet d'un suivi quotidien et bénéficient de mesures d'enrichissement social et de leur milieu. Toutes les mesures fonctionnelles, sont réalisées sous anesthésie pour réduire au maximum l'inconfort, la douleur et l'anxiété des animaux. La priorité est donnée aux procédures non invasives. Dans tous les cas, des points limites ont été définis pour aider à la décision face à une situation « critique ». Le choix des procédures expérimentales à mettre en œuvre dans le projet tient compte de l'état de l'art et des conseils de scientifiques, experts internationalement reconnus dans le domaine de l'audition.

5423. Dans la peau, le derme est le compartiment dans lequel se développent les manifestations cutanées des maladies auto-immunes. Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) du derme, parmi lesquelles les cellules dendritiques (DCs) et les macrophages, influencent l'activation des lymphocytes T et pourraient donc avoir un rôle clé dans la dérégulation de la réponse immunitaire. Bien que les CPA du derme soient facilement accessibles aux traitements par application cutanée, les efforts pour exploiter leur potentiel anti-inflammatoire dans une thérapie spécifique restent limités à ce jour.

Dans le but de détecter une infection ou le développement d'une tumeur, les CPA capturent en permanence les molécules de leur environnement grâce à des récepteurs d'endocytose appelés lectines. Des anticorps reconnaissant ces lectines ont été utilisés par le passé pour faire parvenir spécifiquement aux CPA des molécules d'intérêt thérapeutique. Notre objectif est similaire, mais fait appel à une protéine provenant de l'enveloppe du virus du Chikungunya (CHIK-sE2), qui possède une affinité exceptionnelle pour les lectines. Cette affinité naturelle est mise à profit par le virus pour infecter les CPA du derme et détourner la réponse immunitaire antivirale.

Nous utiliserons ici la protéine CHIK-sE2, sous une forme purifiée produite en l'absence de virus. Nous souhaitons évaluer *in vivo* la capacité de CHIK-sE2 à transmettre un antigène donné de façon spécifique aux CPA disposant de propriétés anti-inflammatoires. Notre objectif est d'évaluer ainsi la capacité de ce réactif à promouvoir une tolérance vis-à-vis des antigènes caractéristiques de maladies auto-immunes, apportant ainsi une option de traitement aux effets secondaires limités.

Le nombre total de souris est de 240 animaux. Il n'est pas possible de remplacer les animaux car la peau comprend de multiples types de cellules, immunitaires ou autres, dont les fonctions sont régulées par les interactions permanentes qu'elles entretiennent entre elles. Ce système très complexe ne peut pas, à l'heure actuelle, être reproduit de manière fiable par des expériences en culture cellulaire.

Les connaissances rapportées dans la littérature et les tests *in vitro* montrant l'efficacité du ciblage nous permettent de n'utiliser que 20 animaux par groupe, ce qui est le minimum nécessaire à une étude statistique fiable. L'analyse de nos données sera effectuée par des tests statistiques de type ANOVA/Bonferroni. Nous nous efforçons de réduire au mieux une éventuelle souffrance des animaux. Les prélèvements seront effectués sur souris sacrifiées et les injections seront pratiquées sous anesthésie générale par des personnels compétents. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi et observés quotidiennement.

5424. Plusieurs maladies neurodégénératives humaines telles que la maladie de Parkinson ont pu être associées à l'exposition à des facteurs exogènes. Certains de ces facteurs, principalement environnementaux, tels que des métaux lourds, des perturbateurs hormonaux ou encore des produits phytosanitaires ont pu être identifiés. Ils seraient impliqués dans plus de 90% des cas de la maladie de Parkinson. Des études précédentes ont montré que l'exposition de souris à des pesticides peut mimer les différentes phases de la maladie de Parkinson, à savoir en premier lieu la distribution de la protéine alpha synucléine pathologique dans les systèmes nerveux central et entériques.

L'alpha synucléine est une protéine principalement neuronale, et plus précisément synaptique, dont le rôle physiologique est encore assez peu connu. Sa forme pathologique se caractérise par une agrégation de la protéine menant à des pertes neuronales au niveau du cerveau.

Les études publiées récemment dans le domaine des pesticides en lien avec la maladie de Parkinson portent principalement sur l'analyse du cerveau. Cependant, les hypothèses discutées les plus actuelles dans ces maladies humaines mettent en avant la possibilité d'un déclenchement initial de la pathologie au niveau du système nerveux périphérique présent dans le tube digestif résultant de l'exposition à des facteurs exogènes. L'intérêt et l'originalité de cette saisine réside dans l'étude parallèle de l'effet du pesticide dans le cerveau et au niveau du système nerveux entérique, par deux voies d'administration d'un vecteur viral exprimant la protéine alpha synucléine pathologique.

Nous nous proposons d'étudier les modifications cérébrales et entériques de l'alpha synucléine humaine pathologique exprimée par transgénèse virale dans un modèle de souris dépourvu d'alpha synucléine endogène. Deux voies d'administration du vecteur viral seront testées dans des nouveaux nés. La première se fera dans la veine temporale et la deuxième se fera par voie intracérébroventriculaire. Les souris seront ensuite sevrées et l'exposition au pesticide dilué à très faible dose dans l'eau de boisson débutera à 8 semaines d'âge. Ces souris seront exposées pendant 6 ou 12 semaines au pesticide puis mises à mort de façon éthique par injection d'une dose létale de pentobarbital.

Cette expérimentation sera réalisée sur un maximum de 184 nouveau-nés, ce nombre est le plus petit possible compte tenu des conditions expérimentales envisagées. Dans un souci de raffinement, les souris sont hébergées dans des cages enrichies et font

également l'objet d'un suivi individuel, des mesures antalgiques appropriées seront mises en œuvre le cas échéant. Ce modèle d'exposition est le seul à permettre l'étude de l'effet de pesticides sur l'alpha synucléine dans le cerveau et l'intestin, il n'est pas remplaçable par une méthode alternative.

Ce projet permettra, à plus long terme, la mise en place d'un modèle d'essai pertinent dans l'évaluation du rôle de substances chimiques environnementales telles que les produits phytosanitaires, dans le développement de maladies neurodégénératives humaine.

5425. Les lipides font partie des 7 constituants de base de l'alimentation humaine. De très nombreuses études épidémiologiques ont établi leur implication déterminante dans la susceptibilité à plusieurs pathologies, en particulier celles liées au vieillissement. L'influence du statut lipidique est largement admise sur les maladies cardiovasculaires et métaboliques (l'obésité et le diabète), mais aussi sur le risque de déclin cognitif et de maladies neurodégénératives. Ce projet se focalise sur l'influence des lipides alimentaires sur le vieillissement cérébral et les fonctionnalités neuronales. Le rôle neuroprotecteur par l'acide docosahexaénoïque (DHA), un acide gras oméga-3, a été démontré chez la souris sur le stress amyloïde associé à la maladie d'Alzheimer. Les membranes neuronales des souris âgées subissent un remodelage délétère conduisant à des perturbations fonctionnelles pouvant expliquer le vieillissement cérébral. En revanche, ces dysfonctionnements ont pu être prévenus chez les souris âgées supplémentées en DHA, témoignant aussi de l'attention particulière à apporter aux aspects qualitatifs autant que quantitatifs aux apports lipidiques.

Ces mêmes perturbations peuvent aussi se produire dans le cerveau de souris jeunes sous régime hyperlipidique, suggérant un effet « pro-vieillesse » résultant d'une consommation excessive en graisses saturées. Ces travaux seront poursuivis autour de deux questions scientifiques actuellement sans réponse. Le remodelage, et les dysfonctionnements associés, subis par les membranes cérébrales en conséquence d'un régime hyperlipidique sont-ils réversibles ? Si oui, suffit-il de revenir à un régime normolipidique ou une supplémentation nutritionnelle en DHA peut-elle favoriser ou accélérer l'amélioration ou la restauration des fonctionnalités cérébrales ? Ce projet a été conçu pour répondre à ces deux questions.

Le travail sera mené sur des souris C57BL/6JRj, une souche classiquement utilisée en neurobiologie et dans l'étude du métabolisme lipidique pour des études *in vivo* et avec laquelle les résultats évoqués ci-dessus ont été obtenus. L'étude s'articulera sur 2 périodes successives pour une durée totale de 20 semaines, incluant 72 souris mâles âgées de 3 mois. Un premier lot constitué de 60 individus sera réparti en 4 groupes selon les régimes alimentaires. Ces souris seront initialement placées soit sous un régime standard dans lequel les graisses ne représenteront que 10% de l'apport calorique quotidien (groupes 1 et 2), soit sous un régime hyperlipidique riche en graisses représentant 60% de l'apport calorique quotidien, afin d'induire un vieillissement cérébral accéléré (groupes 3 et 4). Dans un second temps, après 10 semaines, les groupes 1 et 3 recevront le régime standard, tandis que les groupes 2 et 4 recevront le régime enrichi en DHA. Quel que soit le type de régime, celui-ci sera en accès libre.

Un second lot de 12 souris supplémentaires sera destiné à valider les effets « pro-vieillesse » induits par le régime hyperlipidique. Il sera euthanasié à la fin de la période d'exposition, c'est-à-dire à la fin de la semaine 10, pour collecte et analyses des tissus.

Les animaux seront hébergés individuellement sur toute la durée de l'expérience, afin d'éviter la mise en place d'une hiérarchie de dominance dans la cage (cette démarche permettra d'éviter qu'une souris empêche ses congénères d'accéder à la nourriture) et également de pouvoir quantifier la prise alimentaire. Le milieu sera enrichi à l'aide de papier carré végétal et de briquettes de bois. Les cages transparentes seront placées les unes à côté des autres sur un portoir, afin que les animaux puissent se voir. De plus, ils pourront communiquer par vocalisations ultra-soniques, et les couvercles des cages étant constitués de grilles ils pourront se sentir. Ainsi, bien que placés individuellement dans leur cage, les souris ne seront pas isolées au sens strict du terme.

L'évolution dans le temps de paramètres biochimiques des animaux du lot 1 (60 individus) sera analysée sur un échantillon sanguin prélevé par voie mandibulaire, à raison d'un prélèvement à trois temps, au début, à 10 semaines (changement de régime), et à la fin de l'étude, soit 3 prélèvements au cours de l'ensemble de la période expérimentale. Selon ce même schéma, l'activité de ces animaux ainsi que leurs performances cognitives seront respectivement investiguées au moyen d'un test de comportement d'openfield (activité) et d'un test du labyrinthe en Y (mémoire à court terme).

La première évaluation comportementale sera réalisée au lancement de l'expérimentation et fournira la ligne de base des performances des animaux, qui seront à nouveau testés à mi-parcours du protocole (semaine 10) afin de mettre en lumière les effets des régimes. Enfin, une dernière évaluation en fin d'expérimentation (semaine 20) révélera si le régime enrichi en DHA est susceptible d'exercer une action curative *in vivo*. À la fin de l'étude (semaine 20), les souris seront euthanasiées pour prélèvement et analyses des structures cérébrales.

Ce type d'étude ne peut être réalisé que sur des animaux vivants, seul niveau d'organisation permettant d'évaluer les effets réels, délétères ou bénéfiques, de ces composants alimentaires sur le fonctionnement cérébral (Remplacer). L'étude sera réalisée sur 72 souris. Cet effectif par groupe est imposé aussi bien par les différents types d'analyses *post mortem* menées sur les cerveaux à la fin du protocole, mais également par le fait qu'il représente le nombre minimum d'individus nécessaire à l'obtention de données comportementales statistiquement exploitables tout en évitant le recours à un nombre excessif d'animaux (Réduire). Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement et l'inconfort évité au maximum au cours de l'expérimentation, de manière à garantir la qualité des résultats (Raffiner). En cas de dépassement de l'un des points limites définis (perte de poids de plus de 20% du poids initial sans récupération au bout de 4 jours, arrêt de la prise alimentaire solide et/ou liquide, état général traduisant une évolution vers la morbidité), les animaux seront mis à mort par une surdose d'anesthésique.

5426. Nos projets de recherche portent sur l'analyse du rôle de la voie TGF-beta (Transforming growth factor-beta) dans la régulation de la myogenèse afin de comprendre les mécanismes régulateurs sous-jacents du développement de la masse musculaire et ceci dans l'objectif d'apporter des éléments utiles au progrès de la médecine régénérative du muscle.

Pour comprendre le rôle de la signalisation TGF-beta, après avoir effectué des expériences *in-vitro* (sur des cellules de myoblastes de souris C2C12) ou *ex-vivo* (sur des fibres musculaires isolées), il est indispensable d'évaluer l'effet de l'activation ou de l'inactivation de cette voie *in-vivo*. C'est pourquoi il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation d'animaux (remplacement).

Nous évaluerons l'effet de la modulation des gènes de la voie de signalisation TGF-beta chez la souris, puisqu'il existe déjà des modèles d'invalidation de gènes de la famille TGF-beta ou encore des lignées transgéniques (Cre/Lox) permettant des mutations spatio-temporelles de gènes de cette famille.

Pour ces expérimentations, nous aurons un total de 18 lignées et nous estimons que nous utiliserons 3000 souris au cours des 5 années de cette demande, soit 600 souris par an. Ce nombre a été calculé en prenant en compte le nombre d'animaux nécessaires pour le maintien des lignées transgéniques à phénotype dommageable, le croisement entre les lignées transgéniques Cre/Lox, pour induire une mutation conditionnelle, et en fonction du besoin de l'analyse statistique pour les expérimentations. Ce nombre est en accord avec les principes de raffinement et de réduction. Les études menées sur ces animaux n'ont pas fait l'objet d'études antérieures dans d'autres pays. De plus, nos manipulations utilisent des procédures simples, en nombre limité et peu douloureuse comme l'injection en intra-péritonéal ou sous-cutanée, ou encore suite à l'anesthésie de l'animal, l'injection intra-musculaire.

5427. Les gliomes font partie des tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte, représentant 80% des tumeurs malignes du cerveau. Ces tumeurs sont invasives et d'évolution fatale. Les gliomes sont classés par l'organisation mondiale de la santé selon leur grade de malignité, leur phénotype glial et leurs altérations moléculaires. Les glioblastomes (GBM, astrocytomes de grade IV) constituent les gliomes les plus fréquents et les plus agressifs ; ils résistent aux traitements disponibles actuellement et récidivent inexorablement. Le microenvironnement des GBM est caractérisé par des niveaux très élevés en cytokines et en cellules du système immunitaire dont l'action est d'empêcher l'élimination des cellules tumorales. Ce processus est appelé immunosuppression et constitue une barrière à l'efficacité des traitements. L'étude de ce processus est par conséquent au centre des recherches en vue du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Un des régulateurs de l'immunosuppression est la sénescence cellulaire.

La sénescence est un mécanisme cellulaire défini par plusieurs propriétés dont l'arrêt de la division cellulaire. Suivant le contexte et le type de protéines que les cellules sénescents secrètent, la sénescence est associée à deux processus antagonistes au cours du développement de la tumeur: la suppression de la tumeur ou la progression tumorale. Dans le cas où les cellules sénescents sont éliminées de façon efficace par le système immunitaire, ce processus cellulaire contribue à la régression de la tumeur. Par contre lorsque les cellules sénescents persistent dans l'organisme, ces cellules sécrètent des molécules qui modifient l'environnement de la tumeur et favorisent sa progression.

Le but de ce projet de recherche est d'identifier et de caractériser la sénescence au niveau des GBM *in vivo* dans deux modèles murins complémentaires. Les modèles murins nous permettront de réaliser des études fonctionnelles en éliminant les cellules sénescents à l'aide d'outils génétiques ou chimiques, ou en induisant la sénescence en irradiant et appliquant une chimiothérapie semblable à celle pratiquée pour soigner les GBM chez les patients.

Nous utiliserons sur 5 ans un total de 624 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) remplacement : les études *in vitro* ne permettent pas l'étude du microenvironnement tumoral pourtant essentiel dans l'étude de la sénescence, par conséquent le modèle murin reste approprié. 2) réduction : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides (8 souris par condition expérimentale) ; 3) raffinement : les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux. Par exemple le protocole d'irradiation sera non fractionné ; le nombre d'animaux utilisé pour l'élimination des cellules sénescents par voie chimique sera réduit par rapport à la technique utilisant des outils génétiques car cette technique est invasive.

Notre point de départ pour ce projet est l'étude de la sénescence sur les prélèvements de patients. Nos résultats préliminaires obtenus à partir de prélèvements de gliomes humains (16 tumeurs de grade 2 à 4, après ou sans traitement) ont mis en évidence de nombreuses cellules sénescents dans les gliomes. Ces cellules sont majoritairement de type glial, notamment astrocytaire, et expriment l'inhibiteur du cycle cellulaire p16^{ink4a}. Ce travail essentiel, reste néanmoins descriptif et l'utilisation des modèles murins demeure le plus approprié grâce notamment aux outils génétiques et aux méthodes de chirurgie du cerveau qui demeurent les références pour adresser la fonction de la sénescence au cours de la gliomagenèse.

5428. L'immunothérapie est un traitement qui vise à mobiliser les défenses immunitaires du patient contre sa maladie. Il s'agit d'une piste importante de la recherche cancérologique actuelle. Le système immunitaire est composé de cellules spécialisées qui assurent la protection de l'organisme contre les attaques extérieures comme les microbes, les virus, etc. qui sont détectés, identifiés, attaqués et éliminés par les défenses immunitaires. Elles devraient aussi reconnaître et détruire les cellules cancéreuses. Pourtant, elles sont souvent incapables de le faire. Les recherches en immunothérapie permettent de mieux comprendre comment les cellules cancéreuses échappent aux défenses immunitaires. Le but des traitements d'immunothérapie est de restaurer la capacité d'action du système immunitaire face aux cellules cancéreuses.

Au contraire, dans les maladies auto-immunes ou lors des traitements anti-rejets de transplantation d'organes, on cherche à freiner ou à bloquer ce système immunitaire.

Dans le cadre de développement de ces immunothérapies innovantes, il est nécessaire de s'assurer que ces molécules n'induisent pas d'effets secondaires irréversibles sur la fonction cardiaque qui rendraient leur développement ainsi impossible. Ce projet de toxicologie évaluera la fonction cardiaque grâce à un ECG (électrocardiogramme) et une échocardiographie suite à une injection d'anticorps.

On peut estimer à 250 le nombre de souris utilisées sur 5 ans.

Afin de suivre la règle des 3R:

- Remplacement: En matière de toxicologie, il est nécessaire à un moment de passer par l'étape *in vivo* et donc ce projet ne peut être réalisé autrement que sur animaux vivants.
- Réduction: Le nombre d'animaux par groupe a été évalué pour être un minimum (10 animaux par injection) permettant d'assurer la robustesse et l'analyse statistique (test non-paramétrique de Wilcoxon).
- Raffinement: Les animaux seront hébergés selon la réglementation en vigueur, dans des cages enrichies de tunnels, avec un accès à l'eau et à l'alimentation *ad libitum*. Les examens électrocardiographiques et échocardiographiques, bien que non douloureux, seront réalisés sous anesthésie générale.

5429. L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique soudain, causé par un infarctus (accident dit ischémique) ou une hémorragie (accident dit hémorragique) au niveau du cerveau, empêchant un apport sanguin suffisant vers ce dernier. Le diagnostic et la localisation des lésions sont effectués grâce à l'imagerie cérébrale, comme l'IRM (technique de choix). Le traitement le plus récent et le plus prometteur de l'accident ischémique semble être la thrombectomie, visant à détruire le caillot responsable de l'occlusion et ainsi restaurer l'apport sanguin (perfusion) du cerveau. Mais cette reperfusion, bien que bénéfique, entraîne également des lésions supplémentaires aux cellules. Le traitement des lésions de reperfusion est donc crucial car il réduit les lésions cellulaires et l'inflammation.

La majorité des essais cliniques a échoué au moment de la translation clinique en raison des trop grandes différences entre le modèle rongeur de l'AVC et la réalité clinique. Le modèle primate est donc un modèle de choix pour ces études. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez ces animaux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiopathologiques chez l'Homme en réponse à un AVC.

Ce projet prévoit donc de mettre en place un modèle d'AVC ischémique avec caractérisation par imagerie TEP/IRM chez le macaque afin d'évaluer, dans une étude ultérieure, l'efficacité d'une molécule d'intérêt ayant déjà fait ses preuves dans le traitement de l'infarctus du myocarde.

Ce projet prévoit au maximum 4 animaux qui proviendront d'un élevage agréé. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel est entièrement formé et complètement accrédité. L'intervention pour la création du modèle sera effectuée par un neuroradiologue interventionnel expérimenté. Les animaux seront sous la responsabilité du personnel de soins approprié.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux lorsque possible, et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (« kong », ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises.

De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

5430. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), première cause de cécité, est un problème de santé publique. Actuellement, 1,5 million de personnes de plus de 60 ans atteintes rien qu'en France en sont atteints et ce nombre est supposé augmenter dans les pays industrialisés. Il existe deux formes : sèche et humide. Pour la forme humide, des hémorragies apparaissent alors que pour la forme sèche une atrophie des cellules rétinienne apparaît. Seule la forme humide est traitée mais de façon non curative et pas à long terme. Ce traitement ne touche que 20% des personnes atteintes. L'objectif de ce projet est d'évaluer de nouvelles solutions thérapeutiques contre DMLA à travers l'administration locale de protéines recombinantes protectrices. Ce projet innovant ne bénéficie pas de validation d'autres autorités à l'heure actuelle. Les stress oxydants et l'inflammation sont les deux processus impliqués dans le développement de la pathologie. Le facteur H du complément (CFH), molécule inhibant l'activation de la voie du complément partie intégrante du système immunitaire innée, a été identifié comme impliqué dans la pathogénie de la maladie depuis la description d'un polymorphisme (Y402H). Ce facteur apparaît alors comme un facteur « bénéfique » pour réduire la DMLA. Au contraire, il a été montré que des dépôts d'amyloïde bêta, connu pour être impliqué dans le processus dégénératif de la maladie d'Alzheimer, s'accumulent au cours du vieillissement au niveau de la rétine externe des souris contrôles. Au contraire du CFH, nous avons émis l'hypothèse que l'amyloïde bêta aurait un effet aggravant sur la DMLA. Notre hypothèse d'un effet bénéfique du CFH et délétère de l'amyloïde bêta s'appuie sur nos travaux qui ont montré que l'injection subrétinienne d'amyloïde bêta dans l'œil de souris mimait les différents processus impliqués dans la DMLA ; et que l'injection de CFH diminue au contraire tous les processus impliqués dans la DMLA. Le but de ce projet est donc d'étudier l'interaction entre CFH et amyloïde bêta, effet bénéfique versus effet délétère, et ce dans l'optique d'identifier des cibles

thérapeutiques efficaces pour lutter contre la DMLA. Pour mener à bien ce projet nous allons utiliser un modèle murin de néovascularisation choroïdienne. Ce modèle consiste à utiliser la photocoagulation par laser pour mimer les différentes caractéristiques observées dans la DMLA formenévovascularaire. Ce modèle va nous permettre de mieux comprendre les mécanismes associés à cette pathologie mais aussi de tester de nouvelles solutions thérapeutiques. Nous allons utiliser 400 animaux correspondant au minimum d'animaux requis pour avoir des résultats significatifs (réduction par utilisation de test statistique) et après des premiers résultats obtenues *in vitro* sur des cellules en culture (remplacement).

5431. Objectif du projet: Evaluation de l'efficacité de nouvelles entités chimiques à produire un effet comédolytique (réduction des comédons) chez la souris Rhino ou à moduler la fonction sébacée chez le rongeur ou chez le Hamster Syrien, après administration unique ou répétée par voie topique ou systémique.

L'acné est une maladie chronique du follicule pilo-sébacé. Le follicule pilo-sébacé est l'association du poil (follicule pileux) et de la glande sébacée qui est responsable de la production du sébum. Cette maladie touche plus particulièrement les adolescents mais se rencontre également chez l'adulte. La physiopathologie de l'acné est reliée à l'hypersécrétion de sébum (hyper-séborrhée), à des anomalies de la kératinisation épithéliale du canal pileux (hyper-kératinisation) qui aboutit à l'obstruction du canal excréteur du follicule pilo-sébacé et à la formation de comédons. Ces lésions peuvent se compliquer d'inflammation liée à des changements dans la microflore cutanée et plus particulièrement à une bactérie anaérobie de la flore cutanée, *Propionibacterium acné*, qui prolifère dans le sébum.

Malgré des recherches approfondies sur l'étiologie de l'acné, la séquence exacte des événements et de leurs mécanismes possibles conduisant à l'élaboration d'un micro-comédon et sa transformation en une lésion enflammée reste inconnue. Aucun animal ne développe spontanément de l'acné et des modèles sont développés pour reproduire au moins une des caractéristiques de la physiopathologie de l'acné.

Ce projet a pour but de démontrer l'efficacité de nouvelles entités chimiques à réduire la kératinisation, les comédons (effet comédolytique) ou à moduler la fonction sébacée chez le rongeur après administration unique ou répétée par voie topique ou systémique.

Les procédures expérimentales mises en œuvre dans ce projet permettront d'évaluer de nouvelles entités chimiques dans des modèles présentant spécifiquement certains critères de la pathologie de l'acné :

- la souris Rhino pour l'aspect comédons et hyperkératinisation

- les rongeurs ainsi que le hamster Syrien pour la fonction sébacée.

Avantages: Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de démontrer l'activité pharmacologique *in vivo* des nouvelles entités chimiques (NCE) sur la base de l'effet comédolytique, de l'effet modulateur de la fonction sébacée et de la tolérance par voie topique. Les données ainsi obtenues contribueront au profilage et à la sélection des meilleurs candidats, pour chaque cible thérapeutique, à utiliser chez l'homme pour le traitement de l'acné.

Domages escomptés: Certaines familles de NCE utilisées peuvent provoquer une réaction inflammatoire de la peau susceptible d'entraîner un certain niveau d'inconfort pour les animaux (par exemple: démangeaisons, sensation de chaleur au niveau de la peau). Cet inconfort pour l'animal sera maîtrisé par le choix des doses des NCE à évaluer et par le recours à un produit analgésique si jugé nécessaire par le vétérinaire en charge du bien-être des animaux.

Méthodes alternatives (principe de remplacement): A ce jour, il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire *in vitro* reconnu qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour évaluer les propriétés comédolytiques et les propriétés de modulation de la fonction sébacée de nouvelles entités chimiques.

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

-Choix des espèces:

La souris Rhino ((hrrhhrrh)) est choisie pour les caractéristiques de sa peau ridée, sans poils avec utricules épidermiques (ou pseudo-comédons) qui présentent de nombreuses similitudes avec les comédons acnéiques humains. Elle est également choisie en raison de l'abondance de littérature sur ce modèle et de l'existence d'outils d'analyse spécifiques comme, par exemple, des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes.

Les rongeurs sont choisis car la fonction et la composition de leurs glandes sébacées et leur séborrhée est largement décrite dans la littérature scientifique ainsi que la concordance par rapport à l'homme. Ils sont également choisis en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles et de l'existence d'outils d'analyse spécifiques comme, par exemple, des anticorps pour la localisation des protéines ou des amorces pour l'analyse de l'expression des gènes.

L'espèce hamster est choisie pour les caractéristiques de sa peau de la face interne de l'oreille qui présente des glandes sébacées androgéno-dépendantes dont la morphologie est proche de celle des glandes sébacées humaines et en raison de l'abondance de littérature sur ce modèle.

-Nombre d'animaux: Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Selon les méthodes d'analyses utilisées (mesure de la taille des comédons et/ou de la glande sébacée sur coupe histologique, etc...) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, 3 à 10 animaux par groupe seront utilisés pour permettre une analyse robuste des résultats générés.

Au total, un maximum de 28 650 souris, 10 350 rats et 2 100 hamsters seront utilisés sur une période de 5 ans.

-Conditions d'hébergement et de soins:

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

5432. Un régime alimentaire soutenu, particulièrement riche en gras, provoque de nombreux effets délétères sur la plupart de nos fonctions physiologiques.

Les raisons qui permettent de rendre compte de ces effets sont multiples.

Parmi elles, l'altération de la qualité de nos membranes cellulaires joue sans doute un rôle important mais dont le mécanisme et l'ampleur n'ont pas été encore aujourd'hui étudiés en détail.

Nous proposons d'évaluer la modification du métabolisme glucidique et lipidique après un régime alimentaire standardisé riche en matières grasses chez le rat, en parallèle avec une évaluation du contenu qualitatif des membranes cellulaires des organes concernés.

Nous espérons mettre en évidence un certain nombre de modifications du métabolisme en même temps qu'une perturbation du contenu lipidique membranaire. Des produits potentiellement correcteurs de la structure membranaire seront alors évalués.

Ces objectifs seront poursuivis sur le rat grâce à :

- Une mesure de la tolérance glucidique sera réalisée par un test de tolérance de glucose et à l'insuline
- Une mesure des concentrations circulantes en lipides (Acide gras, Cholestérol, Triglycérides)

Nous souhaitons par cette étude être capables d'évaluer l'impact fonctionnel de la structure membranaire sur les performances physiologiques de l'organisme et identifier ainsi de nouvelles stratégies thérapeutiques dans la prise en charge des pathologies liées aux dérèglements lipidiques.

Les animaux (8-10 semaines) seront répartis en différents groupes : un groupe contrôle sera constitué de rats élevés et nourris de façon standard. Un groupe HFD aura lui bénéficié d'un régime « high fat diet » depuis plus de 8 semaines. Enfin, un groupe test aura lui également bénéficié d'un régime « high fat diet » mais accompagné d'un traitement par voie buccale avec des correcteurs potentiels de l'intégrité membranaire.

Ce projet a été construit avec la volonté de mettre en place et de respecter « la règle des 3 R ». Seules les expériences absolument indispensables au succès du projet seront mises en œuvre.

Une telle étude doit obligatoirement être conduite sur animal entier et organe entier, nous empêchant d'envisager tout type de remplacement de l'expérimentation animale par une méthode alternative (Remplacement impossible).

Toutefois, une analyse précise des besoins de notre étude nous amène à limiter le nombre d'animaux testés à son minimum (Réduction optimisée).

Afin de mieux organiser nos expériences et ne pas risquer de perdre des animaux en cours de phase de recherche (Raffinement), nous proposons de répartir nos animaux en 3 campagnes expérimentales sur les 2 années de recherche.

Afin d'optimiser les conditions d'hébergements des rats, nous utilisons des cages conformes à la nouvelle législation qui entrera en vigueur au 1-01-2017 (800cm² au sol sur 18cm de hauteur). En outre, les cages contiennent de la litière et des frisottis de papier ainsi qu'un bâtonnet de bois de dimension 10x1,8x1,8cm pour permettre aux rats de mâcher et ainsi éviter des comportements indésirables tels que le mordillement de barreaux ou le gaspillage de nourriture.

Ces campagnes sont organisées comme suit :

Campagne 1 : - Deux groupes : 20 rats de chaque groupe (contrôle et HFD)

Campagne 2 : -Trois groupes : 20 rats de chaque groupe (contrôle, HFD, HFD traités)

Campagne 3: - Idem à 2

Le total d'animaux intégrés à l'étude est donc de 40+60+60 = 160.

A l'issue des explorations métaboliques, les rats seront transférés par un transporteur agréé à l'animalerie de l'université de Poitiers pour des expertises complémentaires couvertes par une autre saisine.

5433. La cardiomyopathie dilatée (CMD) idiopathique est une affection du muscle cardiaque non ischémique qui se caractérise par une dilatation progressive des ventricules et une perte de la fonction contractile. Elle représente la première cause d'insuffisance cardiaque chez le jeune adulte dans nos pays développés. Son étio-pathogénie n'est pas encore complètement élucidée mais semble impliquer la production d'auto-anticorps fonctionnels dirigés contre de nombreux antigènes cardiaques, incluant les récepteurs adrénergiques (RA). La majorité des études portant sur le rôle des auto-anticorps anti-RA dans la pathogénie de la CMD ou de l'insuffisance cardiaque n'a concerné, jusqu'à présent, que les auto-anticorps dirigés contre les RA $\beta 1$. Ces auto-anticorps, présents au niveau du sérum de patients atteints de CMD reconnaissent des épitopes localisés sur la première ou la deuxième boucle extracellulaire des RA $\beta 1$ et induisent au niveau cardiaque des effets chronotrope et inotrope positifs.

Contrairement aux auto-anticorps dirigés contre les RA $\beta 1$, le rôle des auto-anticorps anti-RA $\beta 3$, présents également dans le sérum de patients atteints de CMD, a très peu été étudié jusqu'à présent. Une étude récente a montré que les patients atteints d'insuffisance cardiaque présentaient un taux élevé d'auto-anticorps anti-RA $\beta 3$ par rapport à une personne saine. Le rôle de ces auto-anticorps n'a pas encore été élucidé mais les auteurs ont suggéré que l'augmentation des taux circulants de ces auto-anticorps contribue au développement de l'insuffisance cardiaque chez l'homme. Cette hypothèse est surtout appuyée par les expériences montrant que la stimulation des RA $\beta 3$ induit un effet inotrope négatif et que l'expression de ces récepteurs est fortement augmentée dans l'insuffisance cardiaque. Une autre étude menée très récemment vient appuyer cette hypothèse puisque les auteurs ont montré que plus l'affection évoluait et plus le titre d'auto-anticorps anti-RA $\beta 3$ augmentait parallèlement à l'expression des RA $\beta 3$.

En plus de leur action directe sur les RA $\beta 3$, les auto-anticorps $\beta 3$ pourraient également exercer des effets sur les RA $\beta 1$ grâce à des épitopes communs localisés sur la seconde boucle extracellulaire des deux récepteurs. La stimulation chronique et simultanée

des deux RA pourrait avoir des répercussions majeures sur la fonction circulatoire, mais à l'heure actuelle, très peu d'études ont évalué l'action agoniste directe de ces auto-anticorps $\beta 3$ ou $\beta 1$ dans des modèles animaux.

Notre étude se propose d'évaluer, chez le lapin, les effets sur le système cardiovasculaire des auto-anticorps anti-RA $\beta 1$ ou $\beta 3$ purifiés à partir du sérum de patients atteints de CMD. Le lapin est le modèle le plus approprié pour l'étude des RAb3 cardiaques car il présente un nombre plus important de RAb3 fonctionnels au niveau du cœur que le rat ou la souris.

Pour répondre à cet objectif, deux groupes de 10 lapins (un pour l'étude des RAb1 et l'autre pour les RAb3) seront utilisés par la mise en œuvre d'approches *in vivo* (mesure mini-invasive de la pression artérielle via l'artère médiane auriculaire) et *in vitro* (techniques de cellules et organes isolés).

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Le respect du bien-être animal sera assuré par des conditions d'hébergement adéquates et une observation quotidienne des lapins. Les animaux présentant des troubles de santé graves seront écartés des expériences et euthanasiés. Les approches *in vivo* et *in vitro* qui seront mises en œuvre dans ce projet sont bien maîtrisées par notre équipe. Elles sont complémentaires et permettent de répondre de manière suffisante à l'objectif défini. Il n'existe par ailleurs pas de modélisation mathématique ou *in silico* qui permet d'évaluer la fonctionnalité des autoanticorps anti-RA $\beta 1$ ou $\beta 3$.

5434. Le système nerveux périphérique est une voie de dissémination des cancers, impliquant entre autre des mécanismes de neuro/neuritogenèse dirigée vers la tumeur. Dans le cancer colorectal spécifiquement, le système nerveux présent dans le microenvironnement tumoral est le système nerveux entérique (SNE). Nos résultats préliminaires décrivent l'existence de neurogenèse au sein du SNE en berge de la zone tumorale de cancers colorectaux humains et murins. Les mécanismes de la neurogenèse observée restent actuellement mal compris, et notamment l'origine cellulaire de ces néo-neurones. Des phénomènes de neurogenèse au sein du SNE ont été observés chez la souris adulte en berge de zones intestinales lésées chimiquement. Grâce à un modèle murin Sox10 Cre ERT2 (ser93) dans lequel des lésions chimiques intestinales ont été induites, les cellules Sox10+ ont été identifiées à l'origine de la neurogenèse observée.

L'objectif de notre étude est de déterminer si la neurogenèse observée en berge des cancers colorectaux provient des cellules Sox10+, en induisant une carcinogenèse colique chimique au sein du modèle murin Sox10 Cre ERT2 (ser93).

Tout en tenant compte du principe des 3R (limitation des effectifs, raffinement des conditions d'hébergement des souris en ajoutant des igloos ou des tunnels dans les cages leur permettant de jouer, de se cacher, remplacement quand possible), nous mettrons en place le modèle de colite (déjà bien décrit dans la bibliographie).

Les expériences seront reproduites 3 fois de manière indépendante et ce projet nécessitera au total 180 animaux maximum.

5435. La résistance aux antibiotiques est un problème de santé animale et de santé publique. Un des réservoirs de souches résistantes est constitué par les bactéries pathogènes ou non pathogènes présentes dans le tube digestif des animaux. L'utilisation d'antibiotiques notamment par voie orale constitue un facteur important de sélection de souches résistantes, mais il a été montré que certains additifs alimentaires (métaux, argiles minérales...) pouvaient également influencer le portage de bactéries résistantes, par sélection ou contre-sélection de bactéries résistantes.

Le but du présent projet est d'évaluer l'impact d'un additif alimentaire du commerce sur le portage digestif de souches d'*Escherichia coli* non pathogènes multi-résistantes chez le poulet, et sur le nombre de gènes de résistance présents dans la flore digestive.

Quatre groupes de 45 poussins conventionnels de un jour seront constitués, soit 180 animaux au total. Ces animaux bénéficieront de toutes les bonnes conditions d'élevage. Deux des groupes, placés au sol dans deux parcs d'une animalerie protégée, seront inoculés par voie orale avec deux souches de *E. coli* non pathogènes multi-résistantes. Dans la seconde animalerie, les deux groupes seront disposés pareillement, mais ne recevront pas les souches multi-résistantes. Dans chaque animalerie, un des groupes recevra l'aliment non supplémenté et l'autre groupe recevra l'aliment supplémenté. Des prélèvements de matières fécales seront collectés une fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérimentation à 42 jours d'âge des poulets. Dans chaque lot, dix poulets seront euthanasiés à 21 et 25 jours d'âge et les animaux restants seront euthanasiés à 42 jours d'âge. Sur tous les oiseaux sacrifiés les différents segments du tube digestif seront prélevés. Sur tous les échantillons (matières fécales, segments de tube digestif), un dénombrement des *E. coli* résistants aux antibiotiques et des gènes de résistance sera effectué et les valeurs obtenues pour chaque lot seront comparées afin d'évaluer l'impact de l'additif alimentaire sur la présence de bactéries et de gènes de résistance dans la flore des poulets. Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation animale. Compte tenu de notre expérience, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Le protocole expérimental ne doit pas entraîner de souffrance animale, dans la mesure où 1) les inoculations et traitements sont faits par voie orale, 2) les souches de *E. coli* utilisées ne sont pas pathogènes chez le poulet et 3) les prélèvements sont collectés une fois par semaine et n'engendrent pas de souffrance ou de stress chez les animaux. Enfin, des prélèvements d'organe seront également collectés sur les poulets après euthanasie en fin d'essai.

5436. Les maladies du système nerveux représentent plus de 35% de la totalité des maladies en Europe et ce chiffre est en augmentation constante en partie dû à l'allongement de la durée de vie. Toute atteinte au système nerveux central conduit à des pertes de fonctions vitales telles que la vision dans le cas du glaucome, cognitifs dans le cas d'Alzheimer ou la motricité dans les cas de sclérose en plaque ou lors de lésion de la moelle épinière. Les patients doivent endurer une perte irréversible de ces fonctions puisqu'encore aujourd'hui aucun traitement ne permet de promouvoir la reformation d'un circuit fonctionnel. La

compréhension des mécanismes moléculaires des maladies neurodégénératives et des lésions du système nerveux représentent donc un challenge majeur en biologie dans le but de développer des stratégies thérapeutiques innovantes.

La principale cause expliquant la perte fonctionnelle est qu'à la différence des neurones du système nerveux périphérique, les neurones du système nerveux central ne peuvent pas régénérer leurs axones après une lésion. Ce défaut de régénération conduira dans la plupart des cas à la mort des neurones concernés. La compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la régénération axonale et à la survie neuronale est donc une étape clef dans la compréhension des maladies et leur potentiel traitement.

Le but de ce projet est l'identification des mécanismes moléculaires mis en œuvre au cours des maladies neurodégénératives et après une lésion traumatique dans l'optique de promouvoir la survie neuronale et la régénération axonale. Plusieurs études *in vitro* ont menés à des résultats très prometteurs cependant la mise en œuvre de ces voies *in vivo* s'est révélée un échec. En effet, la repousse axonale est un évènement multicellulaire qui nécessite l'intervention de différents acteurs. De plus nous avons besoin du contexte physiologique afin d'évaluer au mieux la pertinence ces voies moléculaires ciblés pour permettre la repousse axonale et la neuroprotection. Ainsi l'utilisation d'organisme entier est nécessaire. Nous aurons recours à des souris puisque 1) leur système nerveux est proche de celui de l'homme et 2) les techniques de transgénèse sont extrêmement bien développées chez la souris. Ce projet concerne 600 animaux sur une durée de 5ans.

Afin de réduire le nombre d'animaux nous utiliserons au maximum les mêmes animaux contrôles lorsque nous testerons les candidats potentiels favorisant la neuroprotection et la repousse axonale. Nous utiliserons les animaux pour répondre à un maximum de questions. Par exemple nous étudierons la repousse axonale et la survie neuronale en parallèle. Ainsi un même animal répondra à plusieurs questions sans subir d'intervention additionnelle.

Nous serons particulièrement attentifs au bien-être animal puisque chacune des procédures décrites ici ont été préalablement discutées avec un vétérinaire et incluent des protocoles afin de minimiser la douleur ou l'angoisse des animaux.

5437. Le syndrome IPEX ou syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X est une pathologie immune primitive se manifestant par des atteintes auto-immunes sévères chez les garçons, souvent fatale dans la petite enfance. Cette pathologie est la conséquence de mutations dans le gène FOXP3, aboutissant à une perte de fonction des lymphocytes T régulateurs (Treg), qui représentent une petite proportion des globules blancs assurant le contrôle de la réponse immunitaire au soi. Le traitement actuel inclut une immunosuppression, une thérapie hormonale et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Ces traitements ne sont que partiellement efficaces et sont limités par la survenue de complications infectieuses et de toxicité. Ainsi, une alternative thérapeutique efficace doit être développée de façon urgente.

Notre objectif est de restaurer le compartiment de lymphocytes T régulateurs déficient par l'administration d'un vecteur viral. Au préalable, nous proposons de tester cette approche sur un modèle animal de souris présentant la même pathologie afin de vérifier si les cellules corrigées par transfert de gène peuvent guérir la maladie de manière définitive. La souris Scurfy est un modèle de choix qui mime le syndrome IPEX. Ces souris présentent une mutation spontanée du gène Foxp3 aboutissant à l'absence de Treg, l'installation d'atteintes auto-immunes dès 8-10 jours de vie et le décès à 3-4 semaines. Nous allons développer un vecteur viral de grade clinique. Ce vecteur permettra d'apporter une copie fonctionnelle du gène FOXP3 au sein des lymphocytes de patients afin de restaurer leur fonction régulatrice. Ces lymphocytes T corrigés seront ensuite administrés au patient par simple perfusion. Le modèle murin Scurfy sera utilisé dans la mise au point de la stratégie thérapeutique par thérapie génique (requis par l'ANSM). Le nombre de souris utilisée sera de 235 souris Scurfy et 30 souris sauvages.

Pour respecter le principe des 3 R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Afin de limiter la souffrance et l'angoisse des animaux, une surveillance quotidienne sera mise en place, des antalgiques seront prévus. De plus des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

5438. Lorsqu'il s'agit d'une lésion nerveuse, la repousse nerveuse après la réparation se fait chez l'Homme à une vitesse d'un millimètre par jour et elle ne commence que 1 mois après la lésion.

La vitesse de repousse nerveuse est un facteur particulièrement important car plus la lésion nerveuse est loin du muscle dénervé et plus le temps nécessaire pour la ré-innervation de ce muscle est long. Ainsi il faut attendre quelquefois jusqu'à 24 mois pour qu'un muscle retrouve sa fonction. Un muscle dénervé s'atrophie et au-delà de ce délai maximum des 2 ans il perd sa capacité à se ré-innover. C'est pourquoi le temps de repousse est extrêmement important. Si on pouvait l'accélérer on pourrait espérer une convalescence plus rapide et une meilleure fonction.

Des travaux récents concernant les réactions moléculaires lors de la régénération nerveuse mettent en évidence les faiblesses et les limites des greffes nerveuses conventionnelles. Depuis plusieurs dizaines d'années on tente de chercher à améliorer la qualité de réparation ainsi que la vitesse de la repousse nerveuse.

La plupart des travaux scientifiques ont évalué les influences des facteurs de croissance *in vitro*. Ils ont démontré une influence des facteurs de croissance nerveuse sur le développement du tissu nerveux et la formation des axones.

Les essais *in vitro* expliquent les phénomènes d'interaction entre les facteurs de croissance externes et le tissu nerveux, mais les conditions *in vivo* sont différentes, il y a beaucoup plus de facteurs à prendre en compte, c'est pourquoi afin de vérifier l'hypothèse d'influence positive des facteurs de croissance sur la régénération nerveuse périphérique il faut passer à l'étape *in vivo*.

Plusieurs facteurs sont importants dans la régénération nerveuse : la matrice (certaines protéines et certains types de collagène), facteurs de croissance (en injection continue, car la durée de vie dans les tissus est très courte), absence des inhibiteurs (présents pendant un mois après la section du nerf périphérique).

La méthodologie de notre travail scientifique cherche à dresser l'ensemble de ces facteurs importants.

Le but du projet est de créer *in vivo* un modèle de greffe nerveuse en injectant en continue des facteurs de croissance et ainsi voir si ce modèle peut permettre d'accélérer la vitesse de repousse nerveuse. Pour atteindre ces objectifs 18 animaux (porcs) seront utilisés.

Le choix de l'animal est motivé par la physiologie du porc proche à l'humain, mais aussi par la taille (longueur) plus importante des nerfs périphériques – cela correspond au design de l'étude où une longueur de 10cm du nerf périphérique sera nécessaire.

Il est admis que le nombre d'animaux ne doit pas être inférieur à six par groupe, ce qui doit permettre d'avoir les résultats statistiquement fiables. Tout dépendra de la dispersion des données, mais ce facteur ne sera connu qu'après le recueil des données.

Dans la littérature sur les études comparables, le nombre d'animaux par groupe se situe autour de six animaux.

La vitesse de régénération sera comparée dans 3 différents groupes. Les animaux seront opérés sous anesthésie générale. Le modèle de régénération nerveuse périphérique utilisé sera le remplacement d'un défaut de nerf sciatique par des fibres musculaires associées à des facteurs de croissance (NT4). Les facteurs de croissance seront injectés de façon continue par pompe osmotique, système préalablement évalué en *ex-vivo*. Les animaux seront gardés en vie pendant un mois, une analgésie post-opératoire par patch de morphine est prévue. Ensuite, 30 jours plus tard les animaux seront à nouveau anesthésiés puis euthanasiés par surdosage anesthésique et les greffons nerveux seront prélevés pour des analyses histologiques. La longueur de nouveau nerf en cours de régénération sera mesurée. Ce travail pourra valider ou invalider l'hypothèse d'influence positive des facteurs de croissance délivrés en continu sur la vitesse de régénération nerveuse.

Les contraintes imposées aux animaux sont modérées et ne devraient pas induire de modification de leur bien-être.

Les animaux seront surveillés bi-quotidiennement et les point-limites, en accord avec les recommandations internationales seront observés tout au long des expériences.

5439. Chez les mammifères, les milliards de bactéries hébergées dans l'intestin, et qui composent le microbiote intestinal, établissent avec leur hôte des interactions réciproques sous contrôle d'un système immunitaire intestinal extrêmement complexe. Comprendre comment le système immunitaire de l'hôte contrôle le partenariat hôte/bactéries représente un enjeu majeur avec de nombreuses implications en physiologie et pathologie et, actuellement, aucune autre approche que celle sur animal vivant ne permet d'envisager reproduire et analyser ce réseau d'interactions.

L'utilisation de souris gnotobiotiques (souris nées et élevées sous conditions stériles, en isolateur, puis colonisées avec des bactéries individuelles ou des microbiotes plus ou moins complexes) nous a permis de mettre en évidence qu'une bactérie particulière, la bactérie segmentée filamenteuse (SFB), joue un rôle majeur dans la maturation post-natale du système immunitaire intestinal. Comment la SFB exerce ses propriétés immuno-stimulatrices exceptionnelles tout en maintenant l'homéostasie intestinale, et comment cette bactérie s'adapte à son environnement intestinal sont des questions non complètement élucidées auxquelles nous désirons répondre.

Notre projet est basé sur l'utilisation de souris axéniques (dépourvues de germes), maintenues en isolateur. 2884 souris seront nécessaires au projet.

Dans un premier volet, nous étudierons les interactions entre la bactérie SFB et le système immunitaire de l'hôte. Pour étudier les mécanismes du dialogue hôte/SFB, nous comparerons des souris sauvages ou génétiquement modifiées, colonisées par SFB durant une ou trois semaines.

Dans un deuxième volet, nous testerons l'effet combiné, ou non, du régime et de l'environnement bactérien du tube digestif sur l'adaptabilité de la SFB à son environnement. Des souris sauvages adultes seront ainsi monocolonisées par SFB ou co-colonisées par SFB et d'autres bactéries non pathogènes pour la souris. Les souris seront soumises à 4 types de régimes différents (riches en graisses ou en fibres), soit sur une période courte, soit sur une période longue.

Pour ces deux volets, en fin d'expérience, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'analyser les réponses immunes.

En complément du second volet, nous souhaitons tester un moyen de sélection *in vivo* de SFB recombinantes, porteuses d'un marqueur d'antibiorésistance. Des souris axéniques seront colonisées par SFB à l'âge adulte puis recevront, ou non, des doses variables d'antibiotiques n'induisant pas de phénotype dommageable chez la souris. Des fèces des animaux seront collectées tous les 2 jours afin d'y quantifier la SFB et ainsi déterminer la dose minimale d'antibiotique requise pour la sélection. En fin de traitement, les souris seront euthanasiées.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Bien que le maintien des souris en isolateurs soit sans conséquence pour leur bien-être, les souris seront soumises à une surveillance régulière. Pour limiter la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, gavage et injections seront réalisés par du personnel expérimenté ayant l'habitude de travailler en isolateur. Néanmoins, en cas de nécessité, une mise à mort anticipée de l'animal sera effectuée. Par ailleurs, quand cela s'avèrera possible, des alternatives à l'utilisation d'animaux vivants, telles que des essais *in vitro* sur organoïdes ou lignées cellulaires, seront utilisées.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre comment la SFB s'adapte à l'environnement intestinal et d'envisager l'utilisation de cette bactérie, ou des voies utilisées par cette bactérie, pour stimuler les réponses immunes chez l'homme.

5440. Les leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T) sont des cancers agressifs du sang qui surviennent chez les enfants et les adultes. Cette maladie est traitée par de la chimiothérapie conventionnelle qui provoque des toxicités importantes et la survie reste médiocre puisqu'elle ne dépasse pas 80% chez l'enfant et 50% chez l'adulte soulignant l'importance de découvrir de nouvelles thérapies. L'objectif de ce travail consiste à rechercher de nouvelles thérapies ciblées qui vont affecter les cellules tumorales en préservant les cellules normales. Dans ce projet, nous souhaitons tester *in vivo* l'intérêt de tels nouveaux traitements. La classe de

molécules que nous souhaitons évaluer est déjà utilisée chez l'Homme dans d'autres cancers du sang et son innocuité déjà étudiée chez la souris.

Pour cela, nous grefferons des leucémies de patient à des souris immunodéficientes (NSG) et nous testerons l'efficacité de ces drogues. Le critère principal d'efficacité de la drogue sera le suivi de la prise de greffe dans le temps par des prises de sang. Il nous est indispensables de recourir à l'expérimentation sur des souris car, malheureusement, les cellules leucémiques de patient sont fragiles et ne peuvent être maintenues suffisamment longtemps *in vitro*. Il est largement décrit dans la littérature scientifique que la souris est le bon modèle d'expansion des cellules leucémiques. Au total, le nombre de souris utilisées pour ce projet sur une durée de 5 ans est évalué à 660 souris après application des procédures de réduction. Nous serons aussi très attentifs au bien-être des animaux. Afin de ne pas causer de souffrance aux animaux, les injections seront faites sous anesthésie générale et l'euthanasie sera pratiquée lorsque le taux de cellules leucémiques dans le sang sera supérieur à 80%. Afin de réduire le nombre des animaux nécessaires à l'expérimentation, nous appliquerons la méthodologie suivante:

- Quand possible, injections prospectives d'échantillons frais pour limiter les injections rétrospectives sujettes à échec
- Optimisation du matériel issu de xéno greffe pour production multiples (cellules DMSO, acides nucléiques (ADN, ARN), lysats protéiques)
- Mutualisation au sein de l'équipe des ressources cellulaires post-mortem afin qu'un même échantillon xéno greffé puisse être exploité pour différents projets et ainsi éviter l'utilisation itérative de souris.
- Evaluation pharmacologique *in vitro* approfondie sur lignées cellulaires pour optimiser les concentrations de drogues
- Quantification de la viabilité cellulaire avant toute injection pour limiter les échecs de greffe.

Nous espérons que ce projet nous permettra de valider le potentiel de ces nouveaux traitements afin de compléter l'arsenal thérapeutique du clinicien, et d'améliorer significativement les chances de guérison et de survie des patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique.

5441. La sclérodémie (ScS) est une maladie systémique caractérisée par une fibrose cutanée et des anomalies de la microcirculation sanguine. 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. La ScS évoluant dans un contexte de sclérodémie systémique est une maladie chronique évolutive conduisant en quelques années à une insuffisance respiratoire chronique puis au décès. L'hypertension pulmonaire est une complication fréquente et grave de la fibrose pulmonaire avancée menant à l'insuffisance ventriculaire droite. Bien que les mécanismes physiopathologiques restent encore méconnus, plusieurs travaux récents soulignent un rôle central joué par le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF). Récemment, notre laboratoire a développé et caractérisé un nouveau modèle murin d'étude de la sclérodémie systémique. Les études précédentes ont mise en évidence une inflammation pulmonaire caractérisée par une infiltration de facteurs inflammatoires dans le tissu pulmonaire et une augmentation de la production du monoxyde d'azote. Néanmoins, le rôle joué par des facteurs inhibiteurs des facteurs inflammatoires n'a pas été étudié. Des études *in vitro* ont été réalisées sur des fibroblastes afin de déterminer les molécules MIF les plus pertinentes à tester *in vivo*.

Notre projet a pour but de 1) Déterminer si le développement de la sclérodémie systémique chez la souris est associé à un phénotype d'hypertension pulmonaire ; 2) Evaluer l'efficacité d'ISO-1, inhibiteur ciblant les facteurs inflammatoires, contre le développement de la maladie en suivant son effet sur la composante inflammatoire, la fibrose pulmonaire et cutanée.

L'étude *in vitro* de plusieurs molécules nous a permis d'obtenir une nouvelle piste de traitement et d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

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. Cette première procédure conduira à optimiser les modalités thérapeutiques d'injection aux souris.

Par la suite six groupes de souris seront ensuite étudiés car nous réaliserons un test de traitement préventif et un test de traitement curatif. Un suivi quotidien des souris (n total = 246) 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.

Cette étude nous permettra de mieux caractériser notre modèle de sclérodémie systémique induite par l'HOCL chez la souris et de mettre en lumière la présence d'altération vasculaire dans ce modèle. De plus, ces travaux nous permettront de préciser le rôle de MIF dans la fibrose pulmonaire et cutanée ainsi que dans la composante inflammatoire de ce nouveau modèle expérimental de sclérodémie systémique.

5442. Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

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

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

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

Ce projet, incluant un maximum de 96 rats, a pour objectif d'identifier le mécanisme d'action du produit E3, dérivant du produit E1 testé précédemment dans notre laboratoire et présentant des propriétés anxiolytiques. Nous souhaitons savoir si l'effet anxiolytique du produit E3 est comparable à celui du produit E1 et s'il est comparable à celui de la Buspirone, composé pharmacologique de référence agissant sur des récepteurs différents.

L'administration de NAN-190, bloquant l'action de la Buspirone, par voie intrapéritonéale (IP), permettra d'identifier la voie pharmacologique du produit E3 administré par voie orale dans le test d'enfouissement défensif conditionné (EDC) chez le Rat mâle Wistar adulte.

L'étude inclura à 96 animaux répartis en 6 groupes de traitement (Véhicule, Buspirone et Produit E3 avec et sans traitement avec le NAN-190) pour démontrer si le produit E3 a une activité comparable à celle de la Buspirone.

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

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests *in vitro* ou *in silico*) (remplacement). Les essais effectués permettront de déterminer la voie pharmacologique d'action du produit E3 nécessaire pour réduire l'anxiété des animaux dans le test de l'EDC. Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire (réduction) permettant une exploitation statistique des résultats (raffinement).

5443. 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 qui se caractérise par une perte d'une population de neurones, ceux à dopamine. C'est un réseau de structures cérébrales, appelés ganglions de la base (GB) qui contrôle l'exécution du mouvement volontaire et qui dysfonctionne dans la MP lorsque la dopamine vient à manquer dans le cerveau. Dans ce réseau, le globus pallidus externe (GPe) joue un rôle prédominant dans l'exécution et l'arrêt des actions motrices, mais son fonctionnement reste mal compris en particulier comment il est connecté avec le reste du réseau. Pour étudier ces connections, nous souhaitons utiliser des modèles murins exprimant une molécule capable d'être manipulée par la lumière appelée channel rhodopsine en les croisant avec deux lignées murines capable de permettre l'expression de cette ChR2 dans des types cellulaires précis (lignées Cre). Ce projet concerne donc la création de lignées de souris transgéniques par croisement. Nous vérifierons ces modifications géniques ne provoquent pas de phénotype nocif, dans les croisements générés avec 2 lignées Cre. La création de ces croisements nécessitera au maximum 260 animaux (tous génotypes confondus). Pour le respect de la règle des 3R, l'élevage sera minimisé le plus possible pour ne produire que les animaux nécessaires. Si le constat d'un phénotype nocif est fait, les mesures spécifiques seront prises pour le bien être de ces animaux. Il n'existe pas pour l'heure de méthodes alternatives pour répondre aux questions scientifiques que permettra d'aborder l'utilisation des croisements générés dans ce projet.

5444. Notre objectif est de démontrer que l'historiatrie (thérapie par ultrasons focalisés utilisant le phénomène de cavitation - effet mécanique -) est réalisable sur du tissu cardiaque *in vivo* en transthoracique de manière complètement non invasive. Nous devons travailler sur le vivant car le mouvement cardiaque est une des principales difficultés pour l'application de cette technologie. L'application de l'historiatrie *in vitro* (sur tissu statique) a déjà été réalisée à de multiples reprises (remplacement).

Une étude sur huit moutons à thorax ouvert avec implantation d'une bioprothèse calcifiée en position mitrale a démontré l'efficacité de l'historiatrie en aigu sur le gradient trans-valvulaire diminuant de 50% le gradient et augmentant de plus de 50% la surface d'ouverture valvulaire. L'étape suivante sera de tester cette thérapie à thorax fermé sur un animal dont les caractéristiques de la cage thoracique sont plus comparables à celle de l'homme. Or le sternum proéminent du mouton ne permet pas de réaliser des échocardiographies transthoraciques de qualité et donc naturellement nous sommes tournés vers le porc, qui lui permet de réaliser des échocardiographies de bonne qualité avec profondeur d'image comparable (distance cœur-thorax) à celle de l'homme.

Une étude est en cours sur le lapin qui a principalement pour objet de tester l'innocuité de la thérapie au niveau cardiaque et surtout cérébral (embols) car la profondeur thorax-cœur du lapin n'est pas du tout comparable à celle de l'homme.

L'enjeu serait de proposer une thérapeutique non invasive (par ultrasons) pour traiter des pathologies cardiaques normalement traitées par chirurgie ou cathétérisme. L'expérimentation sur le gros animal, de manière non invasive, est une étape indispensable pour démontrer que l'application valvulaire est possible (notamment sur le rétrécissement aortique calcifié) et pour comprendre les limites actuelles de notre technologie (pénétration des ondes à travers la cage thoracique ?, difficultés de suivi du mouvement ?, problème de puissance d'ultrason ?, temps de procédure sur une cible en mouvement ?). De plus, nous avons besoin de travailler

in vivo sur une anatomie cardiaque similaire à l'anatomie humaine (en termes de structures et de dimensions). Le modèle porcin est donc nécessaire : 45 porcs seront requis pour ce projet (la technique sera testée sur valve native des animaux ou sur bioprothèse calcifiée suivant les procédures). Ce nombre permettra de répondre à l'objectif scientifique de ce projet (preuve de concept et de faisabilité) sans utilisation supplémentaire d'animaux. Afin de réduire la souffrance de l'animal, toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale.

L'application de l'histotripsy sur des pathologies cardiaques, et sa validation, ouvrirait des nouvelles perspectives pour la prise en charge de ces pathologies chez l'homme (cardiopathie valvulaire, cardiopathie malformative). Cela permettrait de proposer à long terme une solution thérapeutique non invasive et indolore (uniquement par ultrason), sans chirurgie ni cathétérisme. Cette nouvelle approche si elle s'avère positive transformera la prise en charge des patients avec rétrécissement aortique calcifié.

5445. L'artérite des membres inférieurs (AMI) est une maladie grave, touchant plus de 200 millions de personnes dans le monde. L'AMI est responsable de crampes au niveau des jambes lors de la marche ou la nuit et, à un stade plus avancé, d'ulcères et de gangrène, avec un risque d'amputation. L'AMI est due à des dépôts de cholestérol à l'intérieur des artères, ce qui entraîne un rétrécissement voire une obstruction complète des artères des jambes. Ces rétrécissements limitent l'arrivée du flux sanguin, ce qui est à l'origine des symptômes. Le traitement principal de l'AMI consiste à gonfler un ballon à l'intérieur de l'artère afin d'écraser la plaque de cholestérol et redonner à l'artère un diamètre suffisant. Malheureusement, le risque de nouveau rétrécissement est très important avec des risques pour la santé des malades. Un nouveau type de ballon recouvert d'un médicament censé éviter ces nouveaux rétrécissements, le ballon actif (BA), a été mis au point. Cependant, certains auteurs ont évoqué le risque de migration de médicament dans la circulation sanguine lors de l'ouverture du ballon. L'objectif de l'étude est de savoir si les BA pourraient effectivement causer des migrations de particules de médicament lors de leur gonflement dans l'artère, et boucher les artères du pied.

Cette étude n'est pas réalisable chez l'homme. Il n'existe pas de modèle *in vitro* ni de modélisation informatique adaptés. Pour cela, l'expérimentation animale est indispensable. Quarante lapins New Zealand auront une insufflation de ballon actif pour évaluer ce risque. Ces lapins sont de bons modèles animaux en ce qui concerne la circulation artérielle. Quarante lapins permettront de tester les différents ballons à disposition sur le marché avec un échantillon suffisant de chaque modèle de ballon.

Les lapins auront une anesthésie générale et recevront des médicaments antalgiques avant qu'un BA soit gonflé dans leurs artères. L'artère principale irrigant la patte droite sera liée afin de diriger toutes les éventuelles particules de médicament dans la patte gauche. L'anesthésie sera maintenue pendant toute la procédure qui se déroulera sans réveil. Les médicaments antalgiques seront administrés selon les protocoles usuels, et de manière répétée en cas de mouvement des vibrisses ou des paupières, de réaction motrice ou d'émission de cris malgré l'anesthésie, afin d'éviter toute souffrance inutile aux lapins. Les procédures douloureuses dureront moins d'une heure. Les lapins seront euthanasiés 2 heures après la procédure. Les artères dans lesquelles le BA a été gonflé seront prélevées. Les artères de la patte gauche des lapins seront analysées afin de rechercher des migrations de médicaments. Si l'analyse porte sur une seule patte, c'est parce que la seconde sert de contrôle interne, ce qui évite d'avoir recours à un autre animal témoin, dans le souci de réduire le nombre d'animaux utilisés. Il n'existe pas de méthodes substitutives.

Ce projet se déroulera sur un an. Il a été réfléchi et construit en se basant sur de précédentes études et vise à définir si certains ballons actifs sont toxiques pour l'Homme. En perspective, ce projet permettra de répondre à une question dont la réponse est inconnue à ce jour et aura des conséquences chez l'Homme.

5446. Les neuropathies périphériques impliquent une dysfonction des neurones appartenant au système nerveux périphérique. Elles peuvent avoir différentes causes et se présentent sous plusieurs formes qui rendent le diagnostic et le traitement difficiles.

L'oxaliplatine est une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du côlon, de l'ovaire et de l'estomac, comme traitement de première ligne et dans les traitements adjuvants. Par rapport aux autres dérivés à base de platine, l'oxaliplatine est peu hémato-toxique et n'a pas de toxicité rénale, mais est responsable de neuropathies périphériques. Nous avons démontré dans des travaux précédents que le teslascan, une molécule antioxydante, peut rétablir les sensibilités diminuées par cette chimiothérapie.

La neuropathie périphérique est également observée au cours du diabète.

Notre étude aura pour but d'établir si des molécules anti-inflammatoires et anti-oxydantes ont un effet neuroprotecteur et antitumoral sur les neuropathies périphériques dans des modèles murins de diabète et de neuropathie chimio-induite.

Des expériences préliminaires seront réalisées *in vitro* sur les cellules tumorales issues de tumeurs du colon murin et de lignées cellulaires de neurones. Des modulateurs de l'inflammation et du statut oxydant seront testés sur ces cellules, afin de sélectionner les molécules ayant le plus d'intérêt et de minimiser le nombre de souris utilisées par la suite. Cette étude conduira à optimiser les modalités thérapeutiques, prédire les effets d'une association médicamenteuse avec une chimiothérapie conventionnelle (oxaliplatine) sur la croissance tumorale et l'évolution de la neuropathie périphérique, *in vivo*.

Le modèle de neuropathie périphérique sera réalisé par injection d'oxaliplatine. Les souris seront traitées avec les molécules anti-inflammatoires, puis nous mesurerons leur sensibilité au froid et au touché grâce à différents tests comportementaux. Dans un second temps nous implanterons des tumeurs sous-cutanées à des souris que nous soumettrons à la chimiothérapie afin de traiter leur tumeur mais également pour suivre l'évolution de la neuropathie périphérique chimio-induite en parallèle de la croissance tumorale. Nous suivrons ainsi les effets de notre molécule à la fois sur la neuropathie périphérique, mais également sur la croissance tumorale. Pour cela nous mesurerons la progression de la croissance tumorale en parallèle des tests de sensibilité. Nous réaliserons les mêmes protocoles de traitement sur un modèle de tumeur eutopique du côlon, induit chimiquement.

En parallèle, un modèle de souris rendues diabétiques par injection de streptozotocine sera étudié avec et sans traitement de molécules anti-inflammatoires afin de déterminer les effets de notre molécule sur la neuropathie périphérique du diabète.

Un suivi quotidien des souris (n total 892) nous permettra d'évaluer les effets d'une molécule antioxydante et anti-inflammatoire sur la neuropathie périphérique chimio-induite, sur la croissance de tumeurs sous-cutanées et sur la neuropathie périphérique du diabète, tout en contrôlant leur bien-être en respectant les points limites de taille de tumeur et d'état général des animaux. De l'enrichissement est placé dans chaque cage afin de ne pas perturber le comportement des souris.

5447. Les syndromes cardio-rénaux (SCR) regroupent un ensemble de pathologies dans lesquelles l'atteinte primaire de la fonction d'un organe, le cœur ou le rein, entraîne une dysfonction ou aggrave la dysfonction de l'autre organe.

Le SCR de type 3 désigne une insuffisance cardiaque aiguë secondaire à une agression rénale aiguë. Il est connu que la survenue d'une ischémie rénale aiguë peut s'accompagner d'altérations structurelles et fonctionnelles d'organes distants dont le cœur et que la survenue d'une insuffisance cardiaque dans le cadre d'une agression rénale aiguë est associée à une surmortalité. Cependant, la physiopathologie du SCR-3 est complexe et encore très mal comprise. Elle fait intervenir différents échanges et systèmes de compensation entre le cœur et le rein, impliquant une dérégulation hormonale, des mécanismes de stress oxydant et d'inflammation, sans identification précise et connue des cibles cardiaques responsables de la dysfonction du myocarde.

La fibrose cardiaque a été décrite comme une caractéristique clé des dommages cardiaques dans de nombreuses conditions. Sur ce point, la Galectine-3 (Gal-3) peut jouer un rôle majeur dans le développement de la fibrose des organes. Dans le rein, l'expression de Gal-3 s'accroît après l'IRA et est associée à la progression de l'inflammation rénale et de la fibrose. Dans le cœur, l'induction de Gal-3 a été démontrée pour favoriser la fibrose myocardique et l'évolution de l'insuffisance cardiaque. Gal-3 est connue pour être synthétisée dans le cœur par les macrophages, de même pour le rein mais également et majoritairement par les cellules tubulaires. Pour mieux comprendre la contribution des cellules myéloïdes (monocytes, macrophages) dans la synthèse et l'expression de Gal-3 dans le SCR-3, nous utiliserons un modèle expérimental de greffe de moelle osseuse (MO).

Dans cette étude, nous utiliserons 250 souris (WT et génétiquement modifiées: KO Gal-3) qui auront dans un premier temps une greffe de MO puis dans un second temps une ischémie/reperfusion rénale.

1) un modèle de greffe de MO chez des souris préalablement irradiées.

2) un modèle d'Ischémie/Reperfusion rénale unilatérale plus néphrectomie du second rein dans le but d'induire une insuffisance rénale aiguë. Cette opération consiste en un clampage de l'artère rénale pendant une durée déterminée puis à un dé-clampage de manière à permettre à nouveau la circulation sanguine dans le rein. L'ischémie prolongée va entraîner une diminution de la filtration glomérulaire et une augmentation de la créatinine et de l'urée dans le plasma traduisant d'une ARA.

Après la mise à mort des animaux, le sang et les tissus (cœur, rein, foie, poumons, cerveau, aorte, et muscle squelettique) sont prélevés, stockés et dédiés aux analyses moléculaires, biochimiques et histologiques. Le suivi longitudinal (par échocardiographie, mesure de pression) et le prélèvement de tous les organes, permet une réduction significative du nombre d'animaux.

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 myocarde et des échanges entre cellules, tissus et organes.

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 "3R". Afin de garantir le bien-être des animaux une surveillance quotidienne après les procédures expérimentales et le recours à des analgésiques sont préconisés. Si les effets bénéfiques de la modulation de Gal-3 dans l'insuffisance cardiaque aiguë, secondaire à une IRA, sont confirmés, nous pourrions envisager de définir des cibles d'intérêt thérapeutiques afin de diminuer leur morbi-mortalité.

5448. Ceci est un complément du projet 00984.02 "Etudes des gènes impliqués dans le neurodéveloppement et mutés dans des malformations corticales". Il comporte 3 nouvelles procédures concernant des lignées de souris non pas étudiées auparavant dans notre laboratoire, mais en utilisant des méthodes similaires à celles décrites dans la première demande.

Notre équipe de recherche est orientée vers l'étude de la physiopathologie des maladies génétiques du retard mental et de l'épilepsie. Nous étudions plusieurs gènes impliqués dans ces maladies. L'objectif général de notre travail est de mieux comprendre le rôle de ces gènes, et des protéines pour lesquelles ils codent, dans le système nerveux central (SNC) et d'éclaircir les mécanismes physiopathologiques. Pour cela, nous utilisons des modèles souris (transgéniques ou spontanés).

Exigences des 3 R :

Les modèles murins que nous étudions sont à ce jour les seuls modèles disponibles. Ils présentent l'avantage de mimer assez bien le phénotype humain. Le développement du cerveau est en effet bien conservé chez la souris, surtout pour les étapes de développement du cerveau qui nous intéressent, favorisant l'identification de phénotypes robustes. De plus, chez la souris, la période de gestation est courte et le nombre d'embryons important, ce qui nous permet de générer un nombre d'animaux suffisant pour plusieurs expériences à partir de relativement peu de fondateurs. Nous pouvons également comparer des souris de type sauvage (WT) et mutantes issues de la même portée, avec une répartition mendélienne. Pour chacune des approches expérimentales, des travaux antérieurs nous ont permis d'ajuster le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique et robuste les conditions mutantes à la condition contrôle avec une excellente reproductibilité.

Nos activités portent une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les souris sont hébergées dans un milieu enrichi et des observations du bien-être sont réalisées 1 fois/jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés, afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences, nous prenons toutes les précautions nécessaires afin d'éviter toute douleur, en utilisant des pratiques adaptées. Les interventions chirurgicales, réalisées sous anesthésie et en présence

d'analgésiques, soulèvent une attention post-chirurgicale particulière (surveillance et traitement des plaies). En cas de comportements anormaux (manque de toilettage, manque d'intérêt pour la nourriture), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour. Afin d'éviter une souffrance de la souris, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés par des méthodes de mise à mort adaptées.

La plupart des gènes que nous étudions sont spécifiquement exprimés dans le SNC et ne sont pas exprimés dans les lignées cellulaires, d'où la nécessité d'étudier les cellules neuronales dans les cerveaux des modèles murins. Certaines lignées de souris mutantes sont déjà établies, représentant des modèles d'épilepsie ou de déficits intellectuels, pour lesquels il est important de continuer la caractérisation afin d'éclaircir la physiopathologie. Pour cela, nous analyserons l'anatomie et la morphologie du SNC de ces souris mutantes, par des méthodes d'histologie, d'immunohistochimie et de microscopie. L'objectif est d'identifier et d'étudier les anomalies du SNC associés aux inactivations de gènes d'intérêt. Des travaux précédents nous ont permis de valider l'analyse des régions cérébrales considérées avec une excellente reproductibilité et donc de réduire le nombre d'animaux requis. L'étude de mécanismes physiopathologiques liés aux déficits des différents gènes d'intérêt, et réalisée par les approches ci-dessus, est nécessaire pour établir des stratégies de correction de phénotype.

L'inactivation de gènes ou l'expression de protéines (par exemple, protéines fluorescentes rapportrices) de manière locale et aigüe chez la souris, *in utero* ou dans le cerveau postnatal, a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes ou transgéniques. Cette approche est donc la méthode de choix quand nous testons la fonction de nouveaux gènes ou l'effet de mutations identifiées par la génétique humaine. Des travaux précédents, nous ont permis de valider ces techniques et donc de minimiser le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Grâce à cette méthode nous éclaircirons les voies biochimiques et mécanismes subcellulaires essentielles pour le développement cortical. Dans le complément de procédures décrit ici, cette approche va nous permettre de mieux caractériser d'une manière efficace des nouvelles lignées de souris.

Nouvelles procédures décrits ici:

Nouvelle lignée étudiée dans le cadre d'un financement obtenu cette année:

Lignée murine *Lis1* KO conditionnelle: Etude réalisée pour un total de 604 animaux et embryons. En plus du croisement de la lignée avec la lignée de souris transgéniques *Emx1-Cre* (mutation dans tout le système nerveux central) pour des études d'immunohistochimies, des approches par électroporation *in utero* seront aussi réalisées afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire à l'étude.

5449. Ceci est un complément du projet 00984.02 "Etudes des gènes impliqués dans le neurodéveloppement et mutés dans des malformations corticales". Il comporte 3 nouvelles procédures concernant deux lignées de souris non pas étudiées auparavant dans notre laboratoire, mais en utilisant des méthodes similaires à celles décrites dans la première demande.

Notre équipe de recherche est orientée vers l'étude de la physiopathologie des maladies génétiques du retard mental et de l'épilepsie. Nous étudions plusieurs gènes impliqués dans ces maladies. L'objectif général de notre travail est de mieux comprendre le rôle de ces gènes, et des protéines pour lesquelles ils codent, dans le système nerveux central (SNC) et d'éclaircir les mécanismes physiopathologiques. Pour cela, nous utilisons des modèles souris (transgéniques ou spontanées).

Exigences des 3 R :

Les modèles murins que nous étudions sont à ce jour les seuls modèles disponibles. Ils présentent l'avantage de mimer assez bien le phénotype humain. Le développement du cerveau est en effet bien conservé chez la souris, surtout pour les étapes de développement du cerveau qui nous intéressent, favorisant l'identification de phénotypes robustes. De plus, chez la souris, la période de gestation est courte et le nombre d'embryons important, ce qui nous permet de générer un nombre d'animaux suffisant pour plusieurs expériences à partir de relativement peu de fondateurs. Nous pouvons également comparer des souris de type sauvage (WT) et mutantes issues de la même portée, avec une répartition mendélienne. Pour chacune des approches expérimentales, des travaux antérieurs nous ont permis d'ajuster le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique et robuste les conditions mutantes à la condition contrôle avec une excellente reproductibilité.

Nos activités portent une attention particulière sur le soin et le bien-être de l'animal. Les souris sont hébergées dans un milieu enrichi et des observations du bien-être sont réalisées 1 fois/jour. Les souriceaux et jeunes animaux sont surveillés, afin de s'assurer que la mère s'occupe bien d'eux. Pendant toutes nos expériences, nous prenons toutes les précautions nécessaires afin d'éviter toute douleur, en utilisant des pratiques adaptées. Les interventions chirurgicales, réalisées sous anesthésie et en présence d'analgésiques, soulèvent une attention post-chirurgicale particulière (surveillance et traitement des plaies). En cas de comportements anormaux (manque de toilettage, manque d'intérêt pour la nourriture), l'état des animaux est surveillé plusieurs fois par jour. Afin d'éviter une souffrance de la souris, les animaux sont anesthésiés et euthanasiés par des méthodes de mise à mort adaptées.

La plupart des gènes que nous étudions sont spécifiquement exprimés dans le SNC et ne sont pas exprimés dans les lignées cellulaires, d'où la nécessité d'étudier les cellules neuronales dans les cerveaux des modèles murins. Certaines lignées de souris mutantes sont déjà établies, représentant des modèles d'épilepsie ou de déficits intellectuels, pour lesquels il est important de continuer la caractérisation afin d'éclaircir la physiopathologie. Pour cela, nous analyserons l'anatomie et la morphologie du SNC de ces souris mutantes, par des méthodes d'histologie, d'immunohistochimie et de microscopie. L'objectif est d'identifier et d'étudier les anomalies du SNC associés aux inactivations de gènes d'intérêt. Des travaux précédents nous ont permis de valider l'analyse des régions cérébrales considérées avec une excellente reproductibilité et donc de réduire le nombre d'animaux requis. L'étude de mécanismes physiopathologiques liés aux déficits des différents gènes d'intérêt, et réalisée par les approches ci-dessus, est nécessaire pour établir des stratégies de correction de phénotype.

L'inactivation de gènes ou l'expression de protéines (par exemple, protéines fluorescentes rapportrices) de manière locale et aigüe chez la souris, *in utero* ou dans le cerveau postnatal, a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes ou transgéniques. Cette approche est donc la méthode de choix quand nous testons la fonction de nouveaux gènes ou l'effet de mutations identifiées par la génétique humaine. Des travaux précédents, nous ont permis de valider ces techniques et donc de minimiser le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Grâce à cette méthode nous éclaircirons les voies biochimiques et mécanismes subcellulaires essentielles pour le développement cortical. Dans le complément de procédures décrit ici, cette approche va nous permettre de mieux caractériser d'une manière efficace des nouvelles lignées de souris.

Nouvelles procédures décrits ici:

Nouvelles lignées étudiées dans le cadre d'un projet ANR (2017-2020):

Lignées murines dynéines: Etude réalisée afin de comparer deux lignées correspondant à deux mutations distinctes (procédure 1: 420 animaux; procédure 2: 580 animaux, total 1000 animaux). L'objectif est d'identifier et d'étudier les anomalies du SNC. En plus de la production des animaux (60 procédure 1), la procédure 1 concerne des études de morphologie (80 jeunes souris analysés en plus des analyses de 120 embryons) et testes de motricité (160 adultes). Des approches par électroporation *in utero* (procédure 2) seront aussi nécessaires impliquant 70 adultes (amplification des lignées) et 30 souris WT, pour des études de prolifération, migration et différenciation neuronale (analyse de 80 souris à jour postnatal 10, et de 400 embryons), permettant la caractérisation d'une manière efficace l'effet par plusieurs approches des mutations dans dynéine.

5450. La dystonie est un trouble moteur caractérisé par des contractions musculaires pathologiques, qui provoquent des postures et/ou des mouvements anormaux et qui engendrent des handicaps importants et douleurs excessives dans les formes graves. La dystonie est parfois le seul symptôme de la maladie, mais elle est aussi présente en combinaison avec d'autres troubles moteurs dans de nombreuses maladies neurologiques, dont la maladie de Parkinson. Les possibilités de traitements médicaux restent relativement limitées, en partie parce que les mécanismes physiopathologiques de cette maladie sont encore mal connus. Des formes de dystonies isolées sont liées à des mutations bien caractérisées et le but de notre recherche est de reproduire chez la souris ces mutations afin de créer des modèles animaux de dystonie. L'obtention de tels modèles constituera une avancée majeure dans le domaine car ils permettront des explorations physiologiques inenvisageables chez l'homme et ainsi de mieux comprendre les mécanismes de la maladie. Ces données seront précieuses pour développer les nouvelles thérapeutiques qui font défaut actuellement dans cette maladie.

Notre étude s'effectuera sur des lignées de souris mutantes, dont certaines créées au cours du programme. Elle cherchera à évaluer le comportement moteur des souris mutantes en conditions normales ou en réponse à des agents neurotropes et elle comprendra des explorations physiologiques pour caractériser les dérégulations du système nerveux central. Le programme nécessitera 1728 souris au total, l'élevage de 10 lignées de souris transgéniques, des opérations chirurgicales, des stimulations *in vivo* par optogénétiques et des traitements par des agents neurotropes.

Des stratégies de bon sens seront appliquées dans l'espoir d'atteindre les objectifs des 3R:

- Une attention particulière sera apportée aux animaux en élevage. Les souris seront hébergées dans un milieu enrichi et leur bien-être sera observé 1 fois/jour. Les portées sont surveillées afin de s'assurer que les mères s'occupent bien de leurs petits.
- Les mutations dans les lignées transgéniques envisagées ne sont pas dommageables pour l'état de santé de l'animal.
- Toutes les précautions nécessaires seront prises afin d'éviter toute douleur, en particulier lors des interventions chirurgicales, par des anesthésies et des analgésiques efficaces. Après les opérations chirurgicales, les animaux seront traités par des antalgiques, leur poids et leur comportement seront surveillés plusieurs fois par jour et des points limites seront définis au-delà desquels les souris seront euthanasiées.
- La microinjection de virus recombinants limitera la consommation d'animaux, en évitant le développement et l'élevage de plusieurs lignées de souris transgéniques.
- Quand cela sera possible et afin de réduire leur nombre, les animaux seront traités par plusieurs agents neurotropes.
- Nos connaissances sur le modèle étudié, notamment sur les pertes liées à la chirurgie, nous permettront de limiter le nombre d'animaux nécessaires pour générer des résultats statistiquement robustes.
- Nous travaillerons indifféremment sur des mâles et des femelles, évitant ainsi la production d'un grand nombre d'animaux inutiles pour nos expériences.

5451. L'épilepsie est un trouble neurologique qui touche 0,8% de la population mondiale. Ses symptômes et signes cliniques sont généralement très invalidants et ses formes les plus graves peuvent aboutir au décès du patient. Bien que l'arsenal de molécules pharmacologiques actuellement sur le marché permette de contrôler la plupart des épilepsies, 30% d'entre elles résistent à tout traitement. Les syndromes épileptiques secondaires à une pathologie cérébrale sous-jacente comme l'accident vasculaire cérébral sont particulièrement difficiles à prendre en charge. Nous avons caractérisé est un peptide synthétique dont l'activité antidépressive telle qu'elle a été démontrée dans plusieurs modèles animaux en fait une molécule extrêmement prometteuse dans le traitement de la dépression chez l'homme. De précédents travaux ont démontré que les effets antidépresseurs de la molécule étaient dus à l'inhibition qu'elle exerce sur un canal potassique et à l'internalisation du complexe que celui-ci forme avec cette protéine d'adressage qui accompagne le canal jusqu'à la surface de la cellule où il peut assurer ses fonctions. Ce canal contribue de manière cruciale au contrôle de l'excitabilité cellulaire. Son inhibition provoque notamment une hyperexcitabilité des neurones qui, en théorie, favorise la survenue de crises d'épilepsie et potentialise les phénomènes excitotoxiques associés aux Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC). Les mécanismes d'action de notre peptide d'intérêt faisaient donc craindre que son utilisation ne s'accompagne

d'effets secondaires particulièrement indésirables. De manière très surprenante, des expériences préliminaires visant à mesurer ces effets chez la souris ont révélé que non seulement il ne promouvait pas les mécanismes épileptogènes et n'aggravait pas les lésions causées par les AVCs aux doses efficaces contre la dépression mais, qu'au contraire, à faible dose, elle diminuait l'intensité de crises épileptiques induites par l'injection de pentylentétrazole (PTZ) ou de kainate (deux molécules utilisées chez la souris pour induire des crises épileptiques) et réduisait le volume des infarctus cérébraux consécutifs à une ischémie focale. Ces résultats inattendus posent à la fois la question des mécanismes explicatifs de tels effets paradoxaux et celle de l'intérêt thérapeutique de notre molécule dans le traitement des AVC et des épilepsies. En l'occurrence, l'ensemble des données acquises suggèrent qu'elle pourrait être particulièrement efficace pour contrôler les crises d'épilepsie secondaires à une lésion cérébrale primitive du type de celles rencontrées dans les AVC. Dans la mesure où les épilepsies secondaires constituent l'essentiel des formes résistantes aux traitements sur le marché, une telle indication présenterait un intérêt majeur. Les efforts réalisés afin d'optimiser l'efficacité de notre peptide ont conduit à la sélection de deux analogues dont l'affinité pour le canal partenaire et la biodisponibilité sont meilleures que celle de la formule originale. La mise au point de ces analogues a été réalisée par des méthodes *in vitro*. Les effets de ces molécules doivent maintenant être testés dans un système intégré reproduisant la symptomatologie des épilepsies humaines. Nous aurons recours à des modèles de référence chez la souris, validés et systématiquement utilisés dans les recherches sur les épilepsies. L'utilisation projetée de lignées de souris mutante ne nous permet pas d'envisager de remplacement plus conséquent. Le présent projet a pour objectif de déterminer si les analogues sélectionnés ont conservés *in vivo* les propriétés protectrices de la molécule d'origine dans l'épilepsie. Afin de répondre à cette question, nous comparerons les effets du peptide d'origine à ceux des deux analogues dans 2 modèles complémentaires d'épilepsie induite chez la souris (partielle et généralisée). Si les résultats escomptés de ces expériences se vérifient, les mécanismes d'action seront explorés grâce à l'utilisation de lignée de souris mutantes pour les cibles des molécules d'intérêt. Dans un souci de réduction, le nombre strictement nécessaire d'animaux utilisés est déterminé sur la base de calcul de puissances statistiques permettant une analyse statistique pertinente des résultats. Par ailleurs la stratégie conditionnelle adoptée permettra d'optimiser le nombre d'animaux mutants utilisés dans les procédures envisagées si les effets de notre molécule d'intérêt sont confirmés. Dans un souci de raffinement l'hébergement des animaux comprendra des éléments d'enrichissements adéquats et un suivi individuel sera assuré en référence à une grille de score permettant de limiter les souffrances potentielles, notamment par la mise en œuvre de points limites précoces et adaptés. Le projet nécessitera l'utilisation de 1840 souris au maximum.

5452. Le projet a pour but de démontrer l'importance du Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C), connu pour induire la mise en place des vaisseaux lymphatiques dans la résistance aux traitements de référence des cancers du rein et du sein. Le cancer du rein à cellules claires (RCC) a comme principale caractéristique d'être incurable et fortement métastatique. Nous avons déjà démontré *in vitro* et *in vivo* sur des cellules de cancer du rein que notre gène d'intérêt est important pour la mise en place et le développement tumoral dans des souris sans système immunitaire. Nous voulons généraliser ces résultats au cancer du sein et les confirmer dans un modèle de souris avec un système immunitaire pour tenir compte de l'influence du système immunitaire. Pour répondre à cette question, nous avons généré des cellules de cancer du sein humaines dans lesquelles notre gène d'intérêt a été invalidé. Ces cellules seront injectées à des souris sans système immunitaire afin de voir si on reproduit nos résultats obtenus avec les cellules humaines de cancer du rein (inhibition de croissance tumorale). Nous avons aussi réussi à obtenir des cellules murines syngéniques de souris BALB-C de cancer du rein et du sein déficientes pour notre gène d'intérêt. Nous les injecterons à des souris avec un système immunitaire actif BALB-C. Les souris seront traitées par sunitinib pour les cellules de cancer du rein. Le sunitinib est un agent qui bloque la fabrication de vaisseaux sanguins. Il s'agit du traitement de référence des cancers du rein métastatique. Le taxol, traitement de référence des cancers du sein métastatiques, sera utilisé dans les expériences avec des cellules de cancers du sein. Ainsi nous évaluerons le rôle du VEGF-C dans la prise, la croissance et la résistance tumorale aux traitements dans ces deux cancers.

D'un point de vue éthique et conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, ces expériences sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences réalisées sur des lignées cellulaires. Ces mises au point *in vitro* nous permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences *in vivo*. De plus, une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite à l'injection des cellules en sous cutanée (croissance tumorale) mais aussi suite à l'administration des différents traitements. Si de tels signes devaient apparaître, les mesures nécessaires seront prises grâce à l'application des points limites clairement définis. Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficient d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dûment qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale. En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études *in vivo* sont nécessaires et non contournables.

Nous avons choisi d'utiliser des souris nude (Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu) (60 individus). Ces souris sont immunodéficientes ce qui permet de réaliser des xénogreffes de cellules humaines dans un modèle murin sans rejet par le système immunitaire. Elles constituent donc le meilleur modèle pour des études de croissance tumorale à partir de xénogreffes de cellules humaines. Ensuite nous utiliserons aussi des souris BALB-C (120 individus).

Des xénogreffes de cellules murines sur des souris avec un système immunitaire sont complémentaires d'expériences réalisées en souris sans système immunitaire. En effet, les souris BALB-C ont un système immunitaire pleinement actif. Ces expériences permettront de déterminer si le système immunitaire influence les effets de l'invalidation de notre gène d'intérêt. Ces modèles animaux sont couramment utilisés dans le monde et ont été beaucoup utilisés par notre équipe. Ces points majeurs nous permettent de réduire le plus possible le nombre d'animaux nécessaires pour nos études dans la mesure de la significativité statistique. Cette

étude vise à mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques dans les cancers du rein et du sein, de nouveaux facteurs de pronostic et des marqueurs qui peuvent contribuer à mieux traiter les patients avec des thérapies de plus en plus personnalisées.

5453. La toxoplasmose est une maladie parasitaire causée par *Toxoplasma gondii* (*T.gondii*) pouvant affecter notamment les petits ruminants (ovins et caprins). Cette pathologie est le plus souvent asymptomatique. On parle de toxoplasmose congénitale lorsque l'infection a lieu pendant la gestation. Dans ce cas, l'infection peut conduire à des avortements et/ou à la mort prématurée des nouveaux nés. Par conséquent, la toxoplasmose congénitale a un fort impact économique et sanitaire en santé vétérinaire.

A ce jour, le seul vaccin commercialisé est composé de la souche sauvage de *T.gondii* S48 (Ovilis, Toxovax, Intervet). Ce vaccin présente néanmoins des inconvénients. Malgré une réduction des avortements de 70-80% chez le mouton et la chèvre, il n'empêche pas la transmission du parasite aux petits. Ce vaccin est peu stable et les animaux récemment vaccinés ne peuvent pas être consommés car ils peuvent transmettre le parasite. Enfin, la virulence de cette souche sauvage n'est pas bien contrôlée et pourrait devenir virulente. Le développement d'une vaccination anti-toxoplasmose efficace et plus sûre est donc nécessaire.

La souche vaccinale développée au laboratoire a déjà démontré son efficacité dans la prévention de la toxoplasmose congénitale chez la souris et la brebis.

Sur la base de cette souche, une souche de seconde génération, dépourvue de gène de résistance aux antibiotiques, a été développée afin d'améliorer la sûreté du vaccin. Il est donc nécessaire de vérifier l'efficacité de cette nouvelle souche vaccinale en parallèle à celle de la souche originelle.

Ce projet comporte 2 objectifs :

- Le but principal de ce projet est de tester l'efficacité des 2 souches vaccinales, en parallèle à l'encontre de la toxoplasmose congénitale dans un modèle murin.

- Les parasites vaccinaux sont cultivés *in vitro*. Le parasite étant par définition un organisme qui vit aux dépens d'un autre organisme, des cellules sont utilisées afin d'obtenir une répllication des parasites. Le second but de cette étude sera de déterminer si les conditions de culture des parasites (type de cellules utilisées) à un impact sur l'efficacité vaccinale de notre nouvelle souche vaccinale.

Le projet comportera 2166 souris au total (mères, mâles reproducteurs et souriceaux inclus) et sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : Le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque l'étude de l'efficacité des souches vaccinales contre la toxoplasmose congénitale ne peut se faire que sur un organisme vivant entier capable de se reproduire.

Raffinement : Le parasite *T.gondii* est capable de former des kystes, forme du parasite persistante et transmissible. Les animaux de ce projet seront donc également utilisés pour vérifier si nos souches vaccinales sont bien dépourvues de leur capacité à produire des kystes.

Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi et seront observés quotidiennement par le personnel de l'animalerie.

Les souris seront hébergées dans des cages comportant des boîtes à œufs en carton et du papier absorbant leur permettant de réaliser des nids ainsi que de petites briquettes en bois.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents et reproductibles, évitant ainsi de refaire plusieurs fois la même expérimentation. Une seule expérience sera réalisée pour répondre aux 2 objectifs afin de limiter le nombre d'animaux contrôlés utilisés.

5454. Le projet pour lequel cette autorisation est demandée vise à utiliser des poissons en vue de la production de moules d'eau douce, appelée grande mulette, de l'espèce *Margaritifera auricularia*. Le projet s'intègre dans un projet européen qui a pour objectif la conservation et le renforcement des populations de grande mulette.

Cette moule, de grande taille (15 à 18 cm), est classée sur la liste rouge de l'UICN, des espèces menacées en voie de disparition, comme en danger critique d'extinction. Or cette espèce passe par une phase de vie larvaire parasite des branchies de poissons. L'adulte émet des larves microscopiques, appelées *glochidies*, qui libérées dans l'eau doivent trouver un poisson hôte dont elles vont parasiter les branchies où elles assureront leur métamorphose en petites moules au bout de 5 à 7 semaines.

Il est donc nécessaire de produire un nombre important de juvéniles par reproduction artificielle.

Des expérimentations en Espagne ont montré que l'esturgeon sibérien (*Acipenser baerii*) est une espèce porteuse. Cependant, la réglementation française n'autorise pas le déversement de cette espèce dans les eaux douces intérieures. Par ailleurs, la présence de jeunes moules, traduit la présence d'espèces porteuses autochtones autres que celle connue dans la littérature, l'esturgeon européen (*Acipenser sturio*) qui a disparu depuis au moins 100 ans.

Aussi le projet pour lequel est demandée cette DAP vise :

- La production de moules en utilisant des esturgeons sibériens,
- La recherche d'espèces hôtes issues de la faune piscicole locale : le silure glane (*Silurus glanis*), l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), la lamproie marine (*Petromyzon marinus*),
- L'optimisation de l'infestation des branchies et la compréhension de processus favorisant l'enkystement des larves dans les branchies des esturgeons. Pour ceci, l'influence de différentes doses de larves infestées et l'effet du stress seront analysés.

L'ensemble du projet nécessitera l'utilisation d'au minimum 795 poissons toutes espèces confondues, un maximum de 1033 peut être retenu en fonction de la mise en charge des bassins et d'une perte éventuelle de 30% liée aux procédures de maintenance et d'expérimentation.

Les procédures qui seront conduites respectent la règle des 3 R :

REEMPLACER : Nous sommes en présence d'une relation de type hôte parasite obligatoire qui ne permet pas de s'affranchir de l'emploi des poissons. Par ailleurs, l'objectif de conservation des espèces poursuivi dans ce projet vise à être au plus proche des relations naturelles afin de ne pas artificialiser la restauration des populations de moules.

REDUIRE : Concernant l'utilisation d'un grand nombre d'esturgeons, l'enjeu de sauvegarde de l'espèce nécessite de produire le plus grand nombre de *glochidies* possible en raison du pourcentage de mortalité très élevé des larves (*glochidies*). La découverte de nouvelles espèces locales de poissons hôtes nécessite l'utilisation d'autres espèces présentes dans le milieu naturel. Le nombre de ces animaux sera réduit au minimum puisqu'il s'agit uniquement de tester le processus de métamorphose complet des larves.

RAFFINER : Suivant l'écologie de l'espèce, des aménagements sont disposés dans les bassins tels que tuyau servant de refuge, végétaux artificiels ou dispositif technique adapté (plaque de repos, supports favorisant l'alimentation ...). De plus, les paramètres physico chimiques de l'eau sont régulièrement contrôlés afin de ne pas induire de stress chez les animaux. Dans le cas de procédures douloureuses ou inconfortables, les poissons seront anesthésiés.

5455. Le but de ce projet est, d'une part de valider l'efficacité d'un traitement d'une maladie rare, la maladie de Pompe, et d'autre part d'étudier sa distribution dans les différents organes après l'administration.

La maladie de Pompe est une maladie génétique rare qui touche les muscles et elle est due à la carence d'une enzyme, l'alpha-glucosidase acide (GAA). Cette enzyme est située dans un compartiment cellulaire voué à la dégradation et au recyclage de différents produits cellulaires.

L'enzyme GAA dégrade le glycogène, un sucre composé qui sert de réserve pour le glucose, et quand elle est absente ou insuffisante le glycogène est accumulé dans les cellules. Cette accumulation provoque des dégâts dans les cellules et les symptômes de la maladie apparaissent.

La maladie de Pompe présente deux formes : une forme infantile sévère, qui touche le cœur, les muscles et la capacité respiratoire des enfants dès les premiers mois de vie et entraîne la mort avant l'âge de 2 ans ; et une forme juvénile/adulte, qui ne touche pas le cœur et présente une progression plus lente, mais qui réduit sensiblement l'espérance de vie.

Le traitement consiste à remplacer l'enzyme manquante par des injections : on parle de « thérapie enzymatique de substitution ». Le traitement actuel a un effet sur la forme infantile, en agissant principalement sur le cœur, mais n'agit pas suffisamment sur les muscles. Souvent il ne permet qu'une stabilisation des symptômes ou une réduction de la progression de la maladie dans la forme adulte de la maladie.

Notre équipe de recherche étudie une nouvelle « thérapie enzymatique de substitution » qui permet d'amener plus efficacement l'enzyme jusqu'à sa cible et une meilleure stabilité du traitement dans le sang.

Des tests antérieurs réalisés sur des cellules issues de patients atteints de la maladie de Pompe ont montré des résultats prometteurs pour notre traitement. Par contre, ces données sont insuffisantes pour montrer le réel potentiel thérapeutique de notre approche.

L'utilisation d'un système plus complexe tel qu'un modèle animal de la maladie de Pompe (souris) est donc une étape nécessaire dans la validation de notre traitement.

L'activité de l'enzyme GAA chez ce modèle animal est très réduite, cependant les animaux grandissent normalement et sont fertiles. Les signes cliniques apparaissent graduellement et ce n'est que vers les 8-9 mois que les animaux ont une forte baisse de mobilité. Les animaux peuvent avoir aussi des problèmes respiratoires en fin de vie, vers les 18 mois d'âge. La souris modèle de la maladie de Pompe a, à la fois, des signes cliniques de la forme infantile et de la forme adulte. Elle est donc considérée comme un bon modèle pour la maladie de Pompe.

Les animaux seront hébergés en cages ouvertes, dans le respect de la réglementation concernant les effectifs par cage, et des nids de ouate seront utilisés pour l'enrichissement.

Les animaux seront injectés avec notre thérapie enzymatique. Des études comparatives seront réalisées pour définir l'intervalle du traitement et évaluer l'efficacité de notre approche par rapport au traitement actuellement commercialisé.

Les thérapies enzymatiques peuvent provoquer des réactions allergiques. Pour éviter cela, les souris recevront un traitement antihistaminique avant la thérapie enzymatique afin d'éviter toute réaction allergique.

L'efficacité de la thérapie sera évaluée en examinant la capacité motrice des souris, grâce à des tests de marche, et en mesurant leur force avec un test qui évalue la force d'agrippement à une grille.

Après le sacrifice, l'état des muscles sera exploré afin d'étudier l'efficacité du traitement par observation microscopique et des dosages biochimiques.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, on réalisera l'étude comparative sur la distribution du traitement dans les différents organes au même temps que celle sur le devenir de la thérapie dans l'organisme après son administration.

La dose choisie sera une dose efficace sans effets toxiques.

Des points limites seront établis dans chaque étude afin d'éviter ou limiter toute souffrance des animaux. Les animaux seront euthanasiés par inhalation de CO₂.

Le nombre d'animaux par groupe pourra varier de 8 à 11, selon l'expérience réalisée et dans le but d'avoir une significativité statistique.

Le nombre total de souris envisagé pour ce projet est de 212. Les données récoltées permettront de valider la thérapie proposée pour la maladie de Pompe et faire progresser le projet jusqu'aux études de toxicologie réglementaires.

5456. Notre processus de production assure l'approvisionnement de matières premières critiques pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

La plupart des animaux de production ou de rente sont élevés en groupe (volailles, porcs, veaux, bovins ...). Pour cette raison, la médecine vétérinaire en élevage est une médecine de population et non d'individus. L'assainissement du cheptel se fait par détection de différentes maladies infectieuses dans les troupeaux, puis traitement des troupeaux infectés. Dans le cas des maladies infectieuses, les tests de diagnostic *in vitro* visent à détecter et à identifier l'agent infectieux responsable (bactérie, virus, parasite, champignon...). Ils sont essentiels pour déterminer le traitement adapté au troupeau. De plus, le diagnostic de certaines affections communes à l'homme et à l'animal, apporte son concours en matière de santé publique.

4 hybridomes ont été développés, secrétant chacun, un anticorps monoclonal (Mab) ultra spécifique de différentes pathologies infectieuses pouvant toucher le cheptel. Ces Mabs entrent dans la composition d'outils de diagnostic biomédical utilisés par de nombreux laboratoires vétérinaires départementaux et à l'international.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (démontrer que tous les efforts ont été tentés pour remplacer la méthode de production *in vivo* par une autre technique), Réduire (optimisation du nombre de souris à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile)

Ces 4 Mabs n'ont pu être caractérisés techniquement et validés que sur des lots issus de production en condition *in vivo*. Des essais très poussés ont été menés pour tenter le transfert de cette production en condition *in vitro* (bio-réacteur). Les résultats concernant la capacité de ces clones à produire *in vitro* le même Mab selon le même cahier des charges (notamment son affinité et sa spécificité) requis pour les dispositifs concernés, démontrent la nécessité incontournable de poursuivre la production de ces Mabs en condition *in vivo*.

Les besoins de santé publique et la nécessité absolue de ces dispositifs exploitant ces Mab et en l'absence de solution alternative, imposent le maintien de la production de ces réactifs.

Le nombre moyen de souris utilisées a été optimisé à 100 par clone par cycle de production. Les souris participant à la totalité de ce protocole sont au nombre de 2000 (100 souris pour 4 clones sur 5 années).

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux.

Une seule paracentèse est réalisée sur l'animal. Le contrôle de la réponse immunitaire des animaux n'est plus nécessaire, ce clone étant exploité depuis de nombreuses années, ce qui permet de réduire le nombre d'actions invasives sur l'animal.

L'euthanasie de l'animal en fin de protocole sera réalisée selon une méthode respectueuse de la réglementation.

5457. Les algues brunes et rouges abondantes dans les Mascareignes (Maurice, Réunion, Madagascar) représentent une source importante de polysaccharides (notamment *carraghénanes et alginates*) qui peuvent être valorisés de différentes façons. Ces polysaccharides peuvent être utilisés pour générer des nanomicelles par un procédé complexe comprenant une digestion enzymatique et un ajout de polymère hydrophobe.

Ces nanomicelles permettent d'encapsuler des molécules protectrices hydrophobes comme la curcumine. L'avantage de ces nanovecteurs est leur capacité à être bio-dégradés et à relarguer progressivement leur contenu. Ainsi, les substances contenues dans ces nanomicelles ne sont pas libérées d'un coup, mais sont libérées progressivement, permettant à ces substances d'agir plus longtemps dans l'organisme. Des tests *in vitro* ont permis de montrer l'efficacité de ces micelles pour la délivrance de curcumine, une molécule aux propriétés anti-inflammatoires. Cependant, il est nécessaire d'étudier la toxicité de telles micelles à l'échelle d'un organisme. Pour cette étude, le poisson zèbre se révèle être un organisme modèle pour investiguer la toxicité de ces nanovecteurs, de la curcumine seule ou vectorisée par ces nanovecteurs. En effet, le poisson zèbre se révèle être un modèle de plus en plus utilisé pour les tests de toxicité et parce qu'il présente une similitude importante avec les grands processus physiologiques des mammifères.

Nous souhaitons tester l'effet d'une injection de nanomicelles, de nanomicelles + curcumine, de curcumine seule et de son véhicule l'éthanol afin d'étudier la toxicité de ces traitements à l'échelle de l'organisme.

Le passage *in vivo* est donc maintenant indispensable. Le modèle animal utilisé n'induit pas de souffrance et les animaux seront traités suite à une anesthésie générale. Les poissons seront surveillés tout au long de l'étude, en cas d'abattement marqué persistant, nous choisirons d'exclure l'animal de l'étude.

Cette étude sera menée sur un total de 60 animaux maximum et pourra permettre à terme de valoriser des nanovecteurs dans le domaine thérapeutique humain.

5458. Notre société développe des colles chirurgicales biocompatibles, biodégradables et flexibles qui peuvent avoir différentes applications cliniques. Un premier produit est en cours de développement et sera testé en clinique prochainement comme colle chirurgicale dans l'indication vasculaire.

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

Les objectifs de ce projet sont d' 1) évaluer et caractériser les propriétés adhésives et mécaniques de nos produits dans différents tissus chez l'animal, 2) évaluer la capacité de nos produits à promouvoir l'étanchéité et régénération des tissus après lésion 3) analyser la capacité de nos produits à délivrer localement des molécules thérapeutiques. Afin de réaliser ces objectifs, le rat a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence. Plusieurs groupes de rats seront utilisés et évalués dans le cadre des procédures expérimentales. Il s'agira de procédures expérimentales classiques, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées. Nous utiliserons sur 5 ans un total de 1464 rats. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) Réduction : le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé au maximum tenant compte, quand applicable, des analyses statistiques qui seront effectuées; 2) Raffinement : une pré-sélection des produits testés sera

effectuée avant les études et les procédures décrites prennent en compte des temps de récupération et un nombre d'essais visant à réduire le stress, la fatigue et la souffrance des animaux ; 3) Remplacement : quand cela sera possible nous effectuerons des études *ex vivo*, utilisant des organes d'animaux sacrifiés dans un autre contexte ou abats de boucherie. Cependant, les études *in vitro* et sur animaux invertébrés ne peuvent pas être envisagées car ces modèles ne permettent pas de mimer les propriétés biologiques et mécaniques des organes entiers.

5459. La crête neurale des vertébrés est une structure embryonnaire transitoire composée de cellules donnant naissance à un très grand nombre de types cellulaires parmi lesquels on peut citer la quasi-totalité des mélanocytes (cellules qui pigmentent la peau), les cellules gliales et certains neurones du système nerveux périphérique et entérique (responsables de la contractilité de l'intestin). Plusieurs maladies congénitales graves, telles que la maladie de Hirschsprung (absence de neurones et cellules gliales affectant la partie distale de l'intestin se traduisant par une occlusion intestinale ou une constipation) et le syndrome de Waardenburg (anomalie des mélanocytes se traduisant par des anomalies de pigmentation et une surdité) ont pour origine une anomalie de ces cellules, et sont regroupées sous le terme de neurocristopathies.

Afin d'étudier les bases génétiques et physiopathologiques de ces deux maladies pédiatriques, nous souhaitons développer un projet comprenant deux objectifs :

Le premier vise à déterminer le rôle d'un des gènes impliqués et ses interactions avec d'autres facteurs connus pour contrôler le développement de la crête neurale. Pour cela, nous souhaitons maintenir une lignée murine portant une délétion du gène d'intérêt afin d'analyser le rôle de ce dernier au cours du développement.

Le deuxième objectif vise à déterminer le rôle d'une modification post-transcriptionnelle. Pour cela, nous souhaitons générer un modèle de souris mutées pour un gène contrôlant la modification d'intérêt et comparer le développement des mélanocytes, du système nerveux entérique et des cellules de Schwann (cellules dérivées de la crête neurale, responsables de la formation de la myéline le long des nerfs périphériques) à ceux de souris contrôles. Au total, 252 embryons, nouveau-nés ou animaux plus âgés seront générés, étudiés et euthanasiés aux stades précoces de l'apparition de phénotypes.

Pour limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, une surveillance journalière sera mise en place et des points limites ont été établis. La réalisation *in vitro* d'études préliminaires et l'utilisation de modèles cellulaires complémentaires aux modèles murins proposés nous permettront de réduire le nombre d'animaux utilisés selon la règle des 3R.

Ce projet permettra de déterminer de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de ces maladies. A terme, ces études permettront d'améliorer le diagnostic chez les patients et améliorer les approches de thérapie cellulaire.

5460. Ce projet vise à l'évaluation préclinique d'un nouveau médicament pour le traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Les leucémies aiguës représentent environ 1% des cancers, soit 3 500 nouveaux diagnostics en 2010 en France (INCa). Les traitements actuels reposent sur la chimiothérapie en association avec l'allogreffe de moelle mais le pronostic global reste médiocre (survie à 5 ans : 5 à 40%) en raison de la fréquence élevée des rechutes. Ces rechutes sont causées par la persistance des cellules souches leucémiques (CSL) insensibles aux thérapeutiques actuelles. Le développement de thérapies permettant de cibler ces CSL est donc un enjeu majeur dans cette pathologie. Ce projet scientifique consiste à évaluer l'efficacité *in vivo* d'une thérapie ciblant spécifiquement ces CSL. Ce nouveau médicament a déjà été testé *in vitro* sur des lignées cellulaires de LAM et sur des cellules primaires de patients et a montré une très bonne efficacité en induisant la mort cellulaire à la fois des cellules de lignées et des cellules primaires issues de patients. Les cellules de patients ne pouvant être maintenues en culture que quelques semaines, il est nécessaire de les greffer dans des souris immunodéprimées afin d'évaluer l'efficacité *in vivo* de ce médicament et particulièrement son efficacité sur les CSL. La durée de ce projet est de 2 ans, il utilisera au total 170 souris. Les souris recevront une greffe de cellules tumorales issues de la moelle osseuse de patients leucémiques par injections intraveineuses avant d'être traitées par une molécule candidate anti-leucémique. Les différentes procédures envisagées ne nécessitent qu'une simple contention de l'animal car elles sont peu douloureuses, elles ne nécessitent donc pas d'anesthésie locale ou systémique. Des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à la disposition des souris : coton, litière papier pour la confection de nids. Il n'existe pas de méthode non invasive substitutive.

Il s'agit d'un modèle préclinique qui permettra de faire la preuve de l'efficacité de ce médicament anti-leucémique *in vivo*, ce qui conduira ensuite à la mise en place d'un essai clinique chez l'homme.

5461. Notre groupe s'intéresse aux pathologies chroniques vasculaires touchant les reins. Les malformations vasculaires du rein sont peu fréquentes mais peuvent avoir des conséquences dramatiques. Elles sont souvent liées à une mutation du gène PIK3CA. Ces mutations, appelées gain de fonction, confèrent à la protéine PIK3CA une augmentation d'activité.

Une molécule développée en cancérologie inhibe l'activité de la protéine PIK3CA. Cette molécule a été testée avec succès chez la souris pour réduire la prolifération de cellules tumorales ainsi que la taille et le nombre de métastases dans des modèles expérimentaux de cancers mammaires et coliques. Les souris PIK3CAmut ont été récemment rapportées dans la littérature comme développant des lésions vasculaires dans les reins par gain de fonction du gène PIK3CA (augmentation du nombre de copie du gène dans les tissus). Nous souhaitons tester l'efficacité d'un inhibiteur de PIK3CA pour prévenir le développement de lésions vasculaires intra rénale dans ce modèle de souris existant.

Le médicament inhibiteur s'administre quotidiennement par gavage dans un volume de 50ul. Le médicament n'a pas de toxicité chez la souris aux doses conventionnelles que nous souhaitons utiliser. Un groupe de souris contrôles recevra un placebo.

Les souris seront étudiées à différents temps de vie afin d'évaluer l'efficacité du médicament pour prévenir le développement des lésions vasculaires.

Tout au long de l'expérimentation nous appliquerons la règle des "3R" avec :

1- Nous remplacerons dès que possible les expériences animales par des expériences in vitro. Pour cela nous utiliserons des cellules endothéliales portant la mutation PIK3CA disponibles dans le commerce. Ces cellules nous permettront de mieux caractériser l'impact de l'inhibiteur sur la voie PIK3CA.

2- Le nombre minimal d'animaux pour avoir la puissance statistique. Nous avons défini statistiquement qu'un nombre de 10 souris par groupe serait suffisant (placebo n=10, inhibiteur n=10).

3- Enfin, nous éviterons toute souffrance inutile des animaux en les surveillant attentivement. Le gavage sera effectué par un technicien expérimenté et diplômé. Le volume des gavages sera réduit au minimum possible soit 50ul par jour.

Les résultats obtenus permettront d'améliorer notre connaissance des malformations vasculaires et peut être l'identification d'un nouveau traitement.

5462. Le LDL-Cholestérol (Low Density Lipoprotein) est un facteur associé aux risques de maladies cardiovasculaires incluant les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Son récepteur (LDL-récepteur) permet l'épuration du cholestérol. La protéine PCSK9 (Protein Convertase Subtilisin Kexin type 9) est capable de se lier au complexe formé par le LDL-Cholestérol et son récepteur et agit comme un inhibiteur naturel du récepteur au LDL.

Au vue de cette observation, de nombreuses stratégies thérapeutiques (exemple : anticorps monoclonaux) ont été mises en place pour inhiber PCSK9 et donc diminuer les taux de cholestérol. Ces anticorps démontrent actuellement une grande efficacité clinique et viennent d'être autorisés sur le marché du médicament.

Néanmoins, quelques études cliniques montrent que les niveaux bas en LDL-cholestérol pourraient être reliés à des transformations hémorragiques suite à un AVC.

L'hyperglycémie et le diabète de type 2 sont des facteurs de risques d'AVC et de fragilisation de la barrière hématoencéphalique (une barrière entre le sang et le tissu cérébral).

L'inhibition de PCSK9 pourrait impacter le bon fonctionnement du métabolisme lipidique au niveau du cerveau et être à l'origine de micro-saignements. Il est important d'investiguer cette piste en condition d'hyperglycémie où la barrière hématoencéphalique est la plus fragile. L'objectif de cette étude est d'étudier si les changements des taux de cholestérols induits par PCSK9 modulent la sévérité des AVC. Pour ce faire, nous utiliserons le modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne par mono filament chez la souris. Ce modèle est très largement décrit dans la littérature. Il permet de créer des AVC et d'analyser les lésions de re-perfusion. Pour étudier l'implication de PCSK9 et du LDL-récepteur dans les AVC et les conditions hyper-glycémiques, nous utiliserons des souris PCSK9 -/- et LDLR -/-.

Les groupes seront constitués d'un nombre minimum d'animaux nécessaire aux analyses statistiques. Il n'y actuellement pas de modèle cellulaire pour étudier la complexité des lésions d'ischémie/re-perfusion sur le tissu cérébral.

Au total, 144 souris seront utilisées pour cette étude.

Lors des expérimentations, les souris bénéficieront d'une administration d'analgésique avant toute incision chirurgicale. Les zones opératoires seront tondues et désinfectées. Les souris seront maintenues sous anesthésie inhalée par de l'isoflurane à 1.5% de concentration alvéolaire moyenne et sur un plateau chauffant afin de prévenir toute hypothermie.

5463. L'autisme est caractérisé par une communication sociale atypique, ainsi que des comportements stéréotypés et des intérêts restreints. Cette maladie, extrêmement répandue, touche une personne sur 100. Notre laboratoire a identifié plusieurs gènes associés à l'autisme. Ces gènes codent principalement des protéines à la synapse, c'est-à-dire aux points de contacts entre les neurones. Le laboratoire s'attache à comprendre les mécanismes moléculaires à la base des comportements atypiques observés chez les personnes avec autisme. Les marqueurs de l'autisme sont donc principalement comportementaux en l'état actuel des connaissances, ce qui implique que l'étude des mécanismes de l'autisme ne peut se faire que sur l'animal vivant. Nous étudions donc le comportement de souris invalidées pour les gènes identifiés au laboratoire, que nous comparons à d'autres lignées de souris témoins au sein du présent projet « La communication sociale chez la souris – applications aux modèles d'autisme ». Notre objectif est de déterminer les mécanismes associés aux déficits comportementaux présents dans l'autisme. Ce projet est un projet de recherche fondamentale, et a pour vocation de faciliter compréhension des mécanismes de l'autisme. Nous comparons les souris invalidées pour les gènes associés à l'autisme aux animaux sauvages de la même portée, et nous testons mâles et femelles. Nous étudions donc le comportement de ces souris, et ce, pour mettre en évidence des anomalies souvent subtiles chez ces modèles. L'utilisation de modèles animaux est donc nécessaire. Nous avons choisi la souris comme espèce pouvant être manipulée génétiquement et dont le comportement est suffisamment connu pour être étudié en tant que modèle de l'autisme. Nous nous concentrons principalement sur les anomalies de la communication sociale, tout en contrôlant les autres comportements tels que la locomotion, l'anxiété, les perceptions sensorielles et les comportements stéréotypés. Sur la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser 1980 souris mâles et femelles sur 5 ans. Les animaux seront testés à tous âges (souriceaux, juvéniles et adultes). Nous nous efforçons de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en ajustant au mieux les protocoles pour obtenir des résultats statistiques robustes tout en tenant compte de la variabilité interindividuelle des animaux testés. Les expériences comportementales réalisées dans les procédures 1 (770 souris) et 2 (1150 souris) ne sont pas considérées comme invasives et n'engendrent qu'un stress limité et très ponctuel. Ces procédures sont donc considérées comme légères. La procédure 3 est considérée comme sévère car elle prive temporairement les 60 souris de leur olfaction. Les animaux sont autant que possible

hébergés en groupe (tant que les protocoles le permettent), pour respecter leur vie sociale. Aucun des tests n'engendrera de conséquences durables sur les animaux.

5464. L'objectif de ce projet est de tester l'effet d'une carence en vitamine D chez la souris femelle sur le métabolisme de sa descendance. Nous étudierons l'impact de cette carence sur la descendance à différents niveaux tels que la masse corporelle, l'adiposité, l'expression génique du tissu adipeux et l'empreinte épigénétique du tissu adipeux.

Les souris femelles C57Bl6j seront nourries pendant 6 semaines avec un régime déficient en vitamine D avant d'être accouplées avec des souris mâles. Ce projet nécessitera l'utilisation de 3 cohortes de 48 animaux, repartis en 3 groupes (femelles alimentation standard, femelles carencées et mâles alimentation standard). Les paramètres tels que l'évolution de la masse corporelle, de la prise alimentaire, l'adiposité, l'expression génique du tissu adipeux et l'empreinte épigénétique du tissu adipeux seront étudiés sur la descendance, soumise à une alimentation standard, à différentes étapes de la vie (juste après la naissance, à la fin de la période de sevrage et à 8 semaines). Des groupes de 10 animaux de chaque sexe sont nécessaires afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les différents paramètres étudiés. Au total ce protocole nécessitera 204 animaux. Les animaux seront hébergés en cage conventionnelle par groupe de 3 ou 4 individus et l'environnement sera enrichi par ajout d'igloo et de nid végétal.

Les données obtenues dans le cadre de ce projet permettront de connaître l'impact de déficiences en vitamine D sur la descendance cela servira de base pour émettre des recommandations nutritionnelles aux femmes en âge de procréer.

Cette étude prend en compte la règle des 3Rs :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier l'impact de la nutrition périnatale. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : les méthodes utilisées sont en majorité non invasives et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de nid végétal.

5465. Le chondrosarcome est défini comme une tumeur maligne primitive de l'os produisant du cartilage tumoral exclusif ou associé à un contingent fibroblastique d'importance variable. Cette tumeur présente la particularité d'être radio et chimio résistante du fait de la nature de son importante matrice chondrogénique. En conséquence la prise en charge thérapeutique est exclusivement chirurgicale et les taux de survie varient de 30 à 80 % à 5 ans suivant l'état de différenciation histologique de la tumeur. Néanmoins, différentes stratégies de recherche (thérapies ciblées, traitements anti-résorptifs...) sont en développement afin de définir de nouvelles options thérapeutiques.

Le protocole expérimental a été développé en prenant en compte la règle des 3 R.

Le modèle utilisé mime le tableau clinique observé chez les patients atteints de chondrosarcome (matrice chondrogénique, atteintes osseuses...) sans possibilité de méthode alternative. L'entretien du modèle syngénique chez le rat par greffe de fragment tumoral est privilégié en raison des grandes difficultés à induire le modèle à partir des cellules cultivées *in vitro*. Aucune molécule thérapeutique efficace n'est connue à ce jour. Des protocoles seront lancés *in vitro* au préalable sur des nouvelles molécules afin de déterminer leur potentielle activité thérapeutique et ainsi rationner le nombre d'animaux pour cette étude. L'utilisation du modèle animal permet d'étudier la pathologie dans un contexte environnemental complexe (vascularisation ; effets secondaires ; microenvironnement ; implication du système immunitaire ...) avant toute application clinique, et ne peut être remplacé.

Nous souhaitons ici renouveler une saisine en nous appuyant sur notre expérience pour limiter le nombre d'animaux. En effet pour les rats, le modèle était auparavant entretenu par greffes tumorales de 6 rats. Dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, notre expérience nous a montré qu'utiliser 3 rats à chaque fois suffit. A raison de 3 animaux par mois durant 5 ans, une utilisation de 180 animaux est prévue pour les 5 prochaines années.

Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de carré de cellulose dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite régulière, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis (développés ci-dessous).

L'objectif est de pérenniser le modèle de chondrosarcome transplantable chez le rat pour générer de plus grands groupes afin de tester des molécules anti-cancéreuses. Avant de lancer tout protocole expérimental, un amendement à cette saisine sera soumis au CEEA. Il précisera le nombre exact d'animaux inclus, le schéma thérapeutique testé, la nature ou fonction de(s) molécule(s) testée(s) et la durée du protocole.

5466. L'objectif de ce projet est la mise au point d'un nouveau biomatériau implantable pour la régénération de nerfs périphériques. Il s'agit d'un projet de recherche qui aborde à la fois des aspects fondamentaux et appliqués dans le secteur biomédical. Nous abordons la problématique de la dégénérescence des nerfs périphériques suite à des lésions neurologiques et nos travaux pourraient avoir un impact majeur à relativement court terme sur le plan médical. Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons évaluer la capacité de 3 de nos biomatériaux, à base de soie, à être implantés chez 90 rats mâles Sprague Dawley et déterminer leur aptitude à stimuler la croissance du nerf sciatique après section. Après avoir identifié les meilleurs biomatériaux par des études *in vitro* et démontré la « preuve de concept » sur différents modèles cellulaires, nous devons désormais mettre en place des tests *in vivo* de régénération nerveuse pour valider nos résultats sur un organisme entier. Les guides constitués de

nanofibres se présentent sous la forme de petits tubes biocompatibles qui seront implantés chez des rats dont le recouvrement fonctionnel sera suivi et évalué durant 8 mois.

Cette étude *in vivo* est réalisée pour compléter et valider les expériences préalablement réalisées *in vitro*. Seules les conditions d'expériences optimisées *in vitro* seront testées *in vivo* (remplacement). Cette étude *in vivo* est indispensable pour valider la régénération nerveuse sur organisme entier. Le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats fiables et statistiquement significatifs a été déterminé et correspond à 18 rats par matériau testé (réduction).

Au cours de cette étude, des procédures d'analgésie sont mises en œuvre si nécessaire, pour limiter/supprimer la douleur et un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) est effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

5467. La borréliose de Lyme est une zoonose transmise par une tique dure du genre *Ixodes* (*I. ricinus* en Europe) et causée par une bactérie appartenant au phylum des spirochètes: *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Le réservoir naturel de la maladie est représenté par les petits rongeurs et certains oiseaux. Une interaction entre le pathogène, le vecteur et l'hôte est nécessaire pour la persistance de la maladie dans la nature. Chez l'homme, impasse bactériologique pour le pathogène, de nombreuses manifestations cliniques sont décrites selon le stade de la maladie mais ce sont des formes cliniques tardives qui posent un véritable problème diagnostique et thérapeutique.

L'objectif de l'étude est de démontrer la persistance de la bactérie dans la peau dans les infections disséminées et leur réactivation possible par une immunosuppression locale par un dermocorticoïde. Nous souhaitons utiliser cette caractéristique de la bactérie pour développer une nouvelle méthode diagnostique chez l'homme basée sur des biopsies cutanées.

Les souris seront d'abord infectées à la seringue en intradermique ou via des tiques avec des *Borrelia* marquées à la luciférase. 40 jours plus tard, la dissémination de la bactérie sera contrôlée en cultivant les organes distants et cibles: le cerveau, l'articulation, le cœur et la peau à distance. La dissémination sera analysée par la culture d'organes et mesurée par PCR quantitatives. Plusieurs protocoles de réactivation de la bactérie seront réalisés à 40 jours: localement avec un dermocorticoïde ou par un corticoïde pris par voie générale. La réactivation de *Borrelia* sera suivie par imagerie intravitale après l'administration des corticostéroïdes.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3Rs:

Remplacement : notre modèle est infectieux. Nous ne pouvons pas travailler sur des organes isolés pour deux raisons principales : i) le but de l'étude est d'analyser la dissémination du pathogène dans différents organes à partir d'une inoculation intradermique; ii) nous souhaitons faire de l'imagerie sur l'animal entier. Un modèle complet est donc nécessaire à cette étude.

Raffinement : Une attention particulière sera apportée aux animaux traités par la cortisone par voie générale afin de limiter leur inconfort et ils seront traités si des douleurs apparaissent (paracétamol en cas de nécessité voire euthanasie). Ils ont également à disposition des enrichissements dans leur cage et restent hébergés en groupe.

Réduction : Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'analyse statistique est un test non paramétrique de Man-Whitney.

Le nombre de souris est de 115 pour un essai donc de 230 si l'essai donne des résultats concluants.

5468. Notre groupe s'intéresse aux pathologies chroniques du rein conduisant à l'insuffisance rénale terminale, pour laquelle les seuls traitements sont la dialyse et la transplantation. Les mécanismes conduisant à la progression des lésions rénales et à l'insuffisance rénale terminale ne sont pas connus et représentent des cibles thérapeutiques. Déchiffrer ces mécanismes est un des défis majeurs de la recherche en néphrologie.

Les pathologies humaines rénales chroniques peuvent être mimées chez les rongeurs, en particulier chez la souris, par une uni-néphrectomie (ablation d'un rein). Les expériences menées trouvent leur justification dans la nécessité de comprendre les mécanismes physiopathologiques conduisant aux lésions rénales et dans l'espoir de développer de nouveaux médicaments permettant de limiter la survenue de l'insuffisance rénale terminale. L'uni-néphrectomie chez la souris est un des modèles intégrés reproduisant assez fidèlement un certain nombre de caractéristiques de la pathologie humaine et de ce fait est très informatif.

Le but de ce projet est d'évaluer le rôle de la protéine RBM3 dans la progression des lésions rénales. Cette protéine participe à l'homéostasie cellulaire en modulant la croissance cellulaire, l'adhésion et la transmission du signal.

Nous anticipons que la perte d'expression de cette protéine favorisera le développement de lésions rénales accélérées. Ces données nous permettront de comprendre précisément son rôle dans l'adaptation à la réduction néphronique. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées dont l'expression de RBM3 aura été invalidée. Ces souris ont déjà été rapportées dans la littérature et ne présentent pas de phénotype spontané particulier. Le nombre d'animaux est justifié par la nécessité d'atteindre des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de souris utilisé sera de 48 au total.

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

Ce projet comporte une seule procédure (uni-néphrectomie) suivie du sacrifice de l'animal deux mois plus tard, avant le développement de lésions rénales susceptibles d'entraîner une souffrance

A terme, les résultats de ce projet devraient permettre de comprendre plus précisément les mécanismes de progression de la maladie rénale et de développer de nouveaux médicaments pour prévenir ou freiner le développement de l'insuffisance rénale chronique.

5469. La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle se caractérise par la mort d'une population neuronale précise, les neurones à dopamine. Cependant, les mécanismes responsables de la mort de ces neurones sont encore mal connus. Au cours des dernières décennies, un certain nombre d'étude a attiré l'attention sur la voie apoptotique comme initiateur de la perte cellulaire survenant au cours de la progression de la maladie. L'apoptose ou mort cellulaire programmée est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire. Elle est physiologique, génétiquement programmée, et nécessaire à la survie des organismes multicellulaires. Dans le cadre de l'étude des causes de la maladie de Parkinson de nouvelles évidences suggèrent qu'une voie de mort cellulaire découverte récemment appelée "nécroptose" pourrait avoir lieu au cours du développement de la maladie. Contrairement à l'apoptose, la nécroptose est dépendante d'une dépense énergétique de la cellule. Le but de notre étude est d'identifier la contribution de la nécroptose à la mort cellulaire dans un modèle expérimental de maladie de Parkinson chez la souris en utilisant une molécule pour inhiber cette voie de signalisation et vérifier si cela nous permet de ralentir ou d'arrêter la progression de la maladie.

Nous utiliserons donc un modèle classique de la maladie de Parkinson chez la souris, celui de la neurotoxine MPTP dont l'injection intrapéritonéale provoque la destruction des neurones à dopamine dans le cerveau. Un groupe contrôle recevra une solution saline. Au préalable, une chirurgie permettra de mettre en place une canule intraventriculaire dans le cerveau des souris, qui permettra d'injecter pendant 21 jours avec un inhibiteur de la voie de la nécroptose. Une groupe contrôle recevra la solution véhicule de cet inhibiteur. Les cerveaux collectés d'étudier si cet inhibiteur a un effet neuro-protecteur par des études biochimiques. Ce projet nécessitera l'utilisation de 48 animaux. Dans le respect du R de réduire, le nombre d'animaux a été défini pour avoir des données statistiquement solides. Il n'est pas possible pour l'heure de reproduire la maladie de Parkinson avec des modèles in vitro, il donc nécessaire d'avoir recours à l'animal pour tester notre hypothèse. Dans le cadre du respect du R de raffiner, les douleurs associées aux procédures seront soulagées par les molécules les plus adaptées et toutes les mesures seront prises pour assurer le bien-être des animaux tout au long de l'étude.

5470. Le développement de nouveaux agents de contraste plus performants, permettant d'obtenir des informations sur l'apparition d'une pathologie à un stade plus précoce ou pour suivre l'efficacité d'un traitement est un domaine de recherche en plein essor.

Parmi les différentes modalités d'imagerie, l'imagerie optique est une technique intéressante car elle est peu coûteuse, facile d'utilisation et elle permet d'obtenir rapidement des informations. Elle nécessite la plupart du temps l'utilisation de sondes (agents de contraste) qui vont émettre un signal lumineux en réponse à une excitation.

Toutefois un inconvénient majeur souvent rencontré avec ce type d'imagerie provient des tissus biologiques qui émettent également un signal lumineux lorsque la sonde est excitée, générant alors un signal parasite appelé auto-fluorescence. Afin d'apporter une solution à cet inconvénient, de nouvelles sondes d'imagerie optique appelées nanoparticules à luminescence persistante permettant de s'affranchir du signal d'auto-fluorescence ont été développées.

Pour aller plus loin dans l'utilisation de ces sondes nous souhaitons obtenir des informations sur leur devenir (évolution, transformation) au cours du temps après administration par voie intraveineuse.

La souris est le meilleur modèle animal permettant de suivre l'évolution d'un agent de contraste au cours du temps. Pour obtenir nos informations, nous envisageons d'injecter les différentes sondes préparées à des souris et ensuite de suivre l'évolution de la luminescence qu'elles émettent au cours du temps. La localisation et l'intensité du signal de luminescence détecté aux différents temps devraient nous permettre d'obtenir des informations sur le devenir de la sonde, et nous pourrions alors savoir si celles-ci se dégradent. Une procédure complémentaire sera réalisée afin de pouvoir également connaître précisément aux différents temps après injection la concentration des sondes dans le sang et dans les principaux organes (foie, rate, reins, poumons, coeur). Cette étude prévue sur 3 ans nécessitera 600 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été conçues afin de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement satisfaisants. Pour cela des essais préliminaires sur cellules seront réalisés afin de ne retenir pour cette étude sur souris que les sondes présentant les meilleures caractéristiques en terme de stabilité et toxicité. Une attention particulière sera portée aux animaux après injection des sondes (des points limites seront établis) et les animaux seront mis en groupe avec enrichissements (jouets, bandes de papier, tunnels en carton).

A terme, cette étude nous permettra de connaître précisément l'évolution de ces nouvelles sondes d'imagerie après injection chez la souris. Ceci constitue une étape indispensable qui nous permettra de poursuivre les recherches sur leur utilisation pour différentes applications de diagnostic préclinique.

5471. L'épilepsie correspond à un ensemble de pathologies qui se caractérisent par une hyperactivité synchronisée de réseaux de neurones du cerveau et qui touche 500000 personnes en France. Il n'existe pas de médicaments permettant de soigner les causes de l'épilepsie mais seulement des anti-épileptiques qui régulent l'activité des réseaux neuronaux excitateurs ou inhibiteurs. Il est donc urgent d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour soulager les patients pharmaco-résistants (aux anti-épileptiques) et/ou véritablement soigner l'épilepsie.

L'épilepsie du lobe temporal (TLE) qui est la forme la plus fréquente d'épilepsie et touche environ 60% des patients. Au cours des dix dernières années, il a été montré que la TLE s'accompagne d'une réaction inflammatoire au niveau des régions les plus touchées, principalement de l'hippocampe, du cortex et du thalamus. Cette réaction repose sur des interactions complexes entre les neurones hyper-excités, les cellules gliales qui les entourent, les constituants de la barrière hématoencéphalique et sans doute aussi le système immunitaire.

Identifier des cibles impliquées uniquement dans l'inflammation, et non dans le fonctionnement normal du système comme le font les anti-épileptiques actuels, serait donc un avantage thérapeutique.

Le but de notre projet est de mieux comprendre comment le dysfonctionnement des cellules gliales affecte la progression de la maladie. Nous disposons pour cela d'un modèle murin de TLE et de lignées d'animaux transgéniques nous permettant de suivre ou de manipuler spécifiquement les cellules gliales.

Seul le modèle souris donne accès à ces outils transgéniques nécessaires à l'étude des mécanismes moléculaires mis en jeu *in vivo*. Par ailleurs, comme mentionné ci-dessous, notre projet vise à étudier les relations entre différents types cellulaires du parenchyme cérébral ainsi qu'entre les systèmes nerveux et immunitaires. Il nécessite donc l'utilisation d'approche *in vivo* et *ex vivo* et ne peut être réalisé par la mise en œuvre d'approches uniquement *in vitro*. Il faut noter de plus que de nombreuses études ont montré que le phénotype des cellules gliales est modifié dans les systèmes en culture. L'approche *in vivo* est donc indispensable à notre projet.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Nous allons utiliser 13 lignées de souris transgéniques et des injections virales permettant la manipulation des gènes dans des populations de cellules spécifiques.

Afin d'étudier l'impact de ces manipulations sur l'épilepsie, nous mettrons en œuvre une combinaison d'approches d'électrophysiologie, d'imagerie, de manipulations génétiques, d'immunohistochimie, et des techniques de biologie cellulaire et moléculaire. Ces approches permettront de mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans les interactions neurone-glie du cerveau épileptique. Les souris épileptiques seront surveillées quotidiennement et seront analysées pendant la phase de latence (3 jours post-injection) pendant la phase d'épilepsie récurrente (3 semaines post injections) et jusqu'à 2 mois post injections.

Cette étude nécessitera 1656 animaux sur cinq ans.

Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

A terme notre projet devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'épilepsie et de développer des outils pharmacologiques ayant moins d'effets secondaires.

5472. La réalisation de travaux pratiques (TP) par les étudiants répond aux objectifs pédagogiques définis dans le programme de formation de la Licence de Biologie. L'unité d'enseignement intitulée « Communication endocrinienne » (3ème année de licence) comprend un TP qui permet d'explorer la régulation hormonale de la glycémie (taux de glucose dans le sang) dont l'homéostasie détermine la survie de l'organisme. Le but de ce TP est de permettre aux étudiants de comprendre des méthodes et principes physiologiques fondamentaux de régulations endocriniennes *in vivo*, qui ne peuvent être remplacés par d'autres outils pédagogiques.

Au cours de ce TP, les étudiants détermineront les effets hypo- ou hyperglycémiantes de l'insuline et de l'adrénaline sur un modèle animal (rat) anesthésié et analgésié et ils étudieront la cinétique d'action de chacune de ces hormones. La glycémie sera déterminée par un dosage enzymatique du glucose à partir de prélèvements de sang effectués au niveau de la veine caudale de la queue de l'animal. Une séance de TP se déroulera sur 4h. Le TP débutera par une présentation des méthodologies développées. On soulignera particulièrement la nécessité d'une approche *in vivo* dans le respect de la règle des 3R avec des procédures expérimentales visant à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des animaux. Un groupe de TP comprend 16 étudiants qui seront répartis en 8 binômes (1 rat/binôme). La moitié du groupe testera les effets de l'insuline tandis que l'autre moitié testera les effets de l'adrénaline. Les résultats de tous les binômes seront notés au tableau afin que tous les étudiants puissent réaliser une analyse globale des effets observés (effet de l'insuline, effet de l'adrénaline, variabilité interindividuelle...). Les données seront interprétées à partir des données théoriques développées en cours et feront l'objet d'un compte-rendu scientifique.

Pour chaque séance de TP, l'enseignant sera assisté par deux personnels techniques habilités (1 encadrant pour 5 étudiants). Ce personnel formé réalisera l'anesthésie des animaux, la mise en place des procédures permettant le raffinement (analgésie, surveillance de l'état d'endormissement des animaux...) et l'euthanasie des animaux en fin de séance. Le nombre d'animaux utilisés sur une année sera de 48 rats (8 binômes x 6 séances de TP) (un maximum de 96 étudiants/an). La demande d'autorisation portant sur 5 années, il est prévu 240 rats au total. Ce nombre sera revu à la baisse en fonction du nombre d'étudiants inscrits dans le module. Enfin, les animaux utilisés pour ces travaux pratiques seront des rats de réforme.

5473. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales de très mauvais pronostic. La chirurgie constitue le traitement de première intention, cependant, du fait de leur caractère infiltrant, ces tumeurs récidivent après exérèse chirurgicale au niveau des berges d'exérèse dans presque 100% des cas. La présence de cellules cancéreuses résiduelles détermine en partie la localisation de la récurrence, le second facteur déterminant étant le remaniement du microenvironnement induit par l'acte chirurgical lui-même. De plus, la chimiothérapie, traitement régulièrement associé à la chirurgie, présente un manque d'efficacité lié à la présence de la barrière hémato-encéphalique qui compromet une délivrance locale du traitement. Développer un système de délivrance localisée permettant de prévenir la prolifération des cellules cancéreuses « dormantes » après ablation de la tumeur pourrait modifier le caractère actuellement inévitable de ces récurrences tumorales.

Pour cette étude, le système de délivrance localisé se présente sous forme d'un hydrogel résorbable ou non et de deux types (A et B). Les hydrogels sont réalisés à partir de polymères naturels. Etudier la biostabilité, la biodistribution, la biodégradation de ces hydrogels ainsi que la réaction locale au contact du tissu cérébral nous permettra de préciser et d'évaluer ce système de délivrance localisé visant à contrer la récurrence tumorale.

Nous souhaitons donc réaliser sur un modèle rongeur une implantation de ces hydrogels. Deux types d'implantation sont prévus. Pour l'hydrogel A, une cortectomie sera réalisée afin d'implanter l'hydrogel directement dans la cavité corticale, deux rigidités d'hydrogels seront testées. Pour l'hydrogel B, une craniotomie sera réalisée et l'hydrogel sera déposé en position épi-corticale. Dans ces protocoles, le projet prévoit le recours à un total de 146 rats Wistar répartis en 119 animaux pour l'étude des hydrogels A et 27 pour l'étude de l'hydrogel B. Ces hydrogels seront implantés pendant une durée de 13 semaines. Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire, en considérant que chaque animal est son propre contrôle (hémisphère controlatéral utilisé comme contrôle chirurgical). Cette démarche permet de réduire le nombre de rats utilisés sans compromettre la validité des expériences menées et en conservant un nombre d'animaux suffisant pour obtenir des résultats statistiques fiables. Le test statistique utilisé sera un test non-paramétrique sur séries appariés (test de Wilcoxon). A ce jour il n'existe pas de modèle alternatif permettant de mimer la réaction du tissu après implantation des hydrogels en site cérébral. Enfin, tous les efforts sont consentis pour détecter et prendre en charge efficacement toute forme de souffrance des animaux, leur état de santé sera surveillé et évalué quotidiennement au cours de l'expérience.

5474. L'allaitement maternel possède d'importants bénéfices sur la santé du nouveau-né à court et à long terme. Par rapport aux nourrissons nourris avec des laits artificiels, les nourrissons allaités présentent un moindre risque de développer des maladies infectieuses et des allergies dans l'enfance mais aussi des maladies métaboliques et cardiovasculaires à l'âge adulte. Les mécanismes sous-jacents à ces effets protecteurs restent encore peu connus. Ainsi, la découverte dans le lait maternel de constituants capables d'agir sur la santé du nourrisson permettrait d'envisager d'importantes approches thérapeutiques et diagnostiques en santé publique.

Le lait maternel est un liquide biologique très complexe contenant de nombreuses molécules bioactives. Il contient notamment plusieurs dizaines d'hormones dont les rôles biologiques restent encore très peu étudiés. L'apéline est une hormone retrouvée à de fortes concentrations dans le lait de plusieurs Mammifères (Homme, Bovin, Rongeur...) mais le rôle de l'apéline du lait est à ce jour inconnu. L'apéline a chez l'adulte de multiples rôles physiologiques comme le contrôle du système cardiovasculaire, de l'équilibre hydrominéral et de l'homéostasie glucidique. Il a été montré récemment que l'apéline sécrétée par l'intestin de l'adulte (souris) est capable d'augmenter l'absorption intestinale du glucose en modulant l'activité des transporteurs intestinaux de glucose. Par ailleurs, l'injection intrapéritonéale d'apéline chez le raton âgé de 1 jour augmente la captation cellulaire du glucose dans le muscle et les poumons, suggérant que l'apéline pourrait avoir un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie glucidique chez le nouveau-né. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'apéline du lait maternel pourrait moduler l'absorption intestinale du glucose du lait chez le nouveau-né.

Pour tester cette hypothèse, nous étudierons tout d'abord si l'administration d'apéline par voie exogène, dans la lumière digestive du nouveau-né, module l'absorption intestinale de glucose dans des anses intestinales isolées *ex vivo* chez des ratons de 12 jours (P12 : milieu de lactation où les concentrations en apéline du lait sont maximales). Ces études nous permettront d'effectuer une mesure du transport trans-épithélial (de la partie muqueuse vers la partie séreuse de l'intestin) de glucose radiomarqué en fonction du temps en présence ou non d'apéline, d'un antagoniste de son récepteur APJ ou d'autres molécules pharmaceutiques pour caractériser les transporteurs impliqués. Dans un deuxième temps, nous validerons nos résultats *in vivo* par des gavages de lait maternel (à des nouveau-nés à P12) additionnés ou non d'inhibiteurs du récepteur à l'apéline pour évaluer le transport du glucose de la partie luminale de l'intestin vers le sang portal et systémique. Une banque de lait maternel sera nécessaire pour ces études, celui-ci sera prélevé chez les rattees allaitantes à P12.

Pour réaliser l'ensemble de ces expériences, nous obtiendrons des femelles allaitantes et des ratons âgés de 12 jours par plusieurs séries de reproductions entre des rattees femelles et des rats mâles pubères de type Wistar Han âgés d'au moins 8 semaines. Au total, deux séries d'accouplements, entre 46 femelles et 20 mâles adultes, nous permettront d'obtenir 63 portées de ratons (504 nouveau-nés à P12 seront utilisés). Au final, 66 rats adultes et 504 ratons à P12 (total de 570 rats) seront utilisés.

Les procédures expérimentales sont conçues pour respecter la règle des 3R et limiter le nombre d'animaux utilisés :

- Principe de remplacement : Il n'existe pas de méthodes alternatives ou de substitution nous permettant d'étudier le rôle *in vivo* de l'apéline du lait maternel sur l'absorption intestinale du glucose chez le raton à P12. L'utilisation du rongeur (rat Wistar) nous permet de réaliser nos reproductions et d'obtenir les nouveau-nés dans un temps raisonnable.

- Principe de réduction : Une partie des femelles primipares vont être réutilisées pour effectuer une deuxième reproduction afin de réduire le nombre de rattees utilisées.

- Principe de raffinement : Les animaux sont surveillés tous les jours afin d'évaluer la présence de signes cliniques modérés de détresse au cours de leur hébergement. Le lien social entre les animaux (mère/nouveau-né sera maintenu jusqu'à P12). Les critères et signes qui permettent d'évaluer le niveau de douleur ou de stress ou la détresse des animaux ont été dégagés sur la base des critères établis par Morton et Griffiths (1985). Chaque procédure expérimentale sera réalisée par un personnel habilité. Lors des manipulations, les stratégies de raffinement des expériences (pièce calme, dispositions pour diminuer l'anxiété des animaux, anesthésie, surveillance de l'état d'endormissement) seront réalisées par le personnel habilité. Lors des procédures expérimentales, les critères et signes permettant d'évaluer la vigilance des animaux et la présence de signes cliniques de détresse/douleur seront particulièrement étudiés. Si un animal présente des signes cliniques de détresse au cours d'une expérimentation, celui-ci sera rapidement euthanasié pour éviter toute souffrance.

5475. Evaluation des propriétés immunogènes d'un vecteur lentiviral codant pour un polyépitope du virus de la dengue

La dengue est une infection virale transmise par le moustique. Elle comprend principalement 4 sérotypes antigéniques différents, et elle affecte, dans les régions tropicales et subtropicales, environ 400 millions de personnes chaque année. Dans 2 à 5% des cas,

la maladie progresse vers des formes plus graves, les symptômes principaux étant une fuite plasmatique, des hémorragies et un choc hypo-volumique.

Alors que les systèmes d'analyse *in vitro* (culture de cellules du système immunitaire en présence d'antigène viraux) permettent d'identifier certains épitopes potentiellement présentés par les cellules dites présentatrices, ils ne permettent pas d'étudier le pouvoir immunogène de ces mêmes antigènes, et donc leur propriété vaccinale. De plus, dans le cas de l'infection par le virus de la dengue, il n'existe pas à ce jour de modèle animal sensible au virus et capable de reproduire la maladie humaine. Il n'est donc pas possible d'évaluer directement *in vivo* le pouvoir immunogène et protecteur d'une préparation vaccinale contre le virus de la dengue. Pour ces raisons, la souris transgénique exprimant certains allèles des molécules d'histocompatibilité de classe I (HLA-A, B et C chez l'homme), constitue un modèle de choix pour évaluer dans un premier temps la réponse immunitaire (cellules T CD8), impliquée dans la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées.

L'avantage de ce modèle animal est qu'il a permis notamment, dans un grand nombre d'infections virales, d'identifier précisément les différentes régions antigéniques cibles des cellules T CD8 du système immunitaire, et d'analyser aussi la qualité et l'intensité de ces réponses, paramètres qui sont déterminants dans l'élaboration d'une stratégie vaccinale efficace.

L'objectif majeur de ce projet est donc d'étudier *in vivo* l'effet de l'injection d'un vecteur lentiviral non intégratif et contenant plusieurs régions antigéniques ou épitopes du virus de la dengue sur la stimulation des cellules T cytotoxiques, jouent un rôle primordial dans la protection à long terme induite lors des vaccinations antivirales.

Pour identifier un nombre suffisant d'épitopes T exprimés par les différents domaines protéiques de la préparation vaccinale, et ceci dans un contexte HLA donné, et pour analyser un nombre significatif d'animaux exprimant un allèle HLA (HLA-A2, A24, B7, et B35), Il est prévu d'utiliser au maximum 100 animaux par an pour ce projet, soit un total de 500 souris sur 5 ans. Des études statistiques seront effectuées pour valider la significativité des résultats obtenus et limiter le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet rentre dans le cadre d'une procédure classifiée comme légère, dans la mesure où les interventions sur l'animal sont limitées à des prélèvements sanguins et à des immunisations réalisées sous anesthésie. L'anesthésie présente de plus l'avantage de réduire le risque de piqûre du manipulateur, l'animal restant immobile lors de l'injection du vecteur lentiviral.

5476. Les taxanes et dérivés de platine sont couramment utilisés en chimiothérapie car ces molécules sont très efficaces pour traiter de nombreuses tumeurs solides (sein, ovaire, testicule, prostate, poumon, tête et nuque...). Cependant, leurs effets secondaires neurologiques tels que des bourdonnements dans les oreilles, acouphènes, vertiges, engourdissements, hypersensibilités à la douleur conduisent les patients à l'arrêt du traitement. Bien que le mode d'action anti-tumoral de ces molécules soit largement décrit dans la littérature, l'état de la recherche ne permet pas à l'heure actuelle de comprendre comment sont induits les neuropathies provoquées par ces traitements chez les patients. A noter que ces effets neurologiques dépendent uniquement du système nerveux périphérique car les agents anticancéreux peuvent l'atteindre. En revanche, ils ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique qui protège le système nerveux central. C'est pourquoi on n'observe pas ou très rarement de neuropathies type moteur pour ces traitements.

L'hypothèse de recherche pour expliquer la survenue de ces effets délétères est que les taxanes et dérivés de platine agissent sur les nocicepteurs et/ou les neurorécepteurs du système nerveux périphérique. Ce sont des canaux ioniques et des récepteurs impliqués dans la nociception.

Dans la bibliographie comme dans nos expériences préliminaires, nous avons mis en place des modèles *in vitro* permettant de perturber l'activité de certains de ces nocicepteurs, notamment grâce à des modèles de cultures primaires de ganglions dorsaux de la moelle épinière. La perturbation des nocicepteurs dans ces modèles *in vitro* a mis en évidence des modifications de la sensibilité à la douleur, notamment par une activation de l'expression de gènes impliqués dans la douleur. Ce phénomène pourrait donc expliquer les effets secondaires observés chez les patients traités par chimiothérapie.

Cependant, afin de valider notre hypothèse, nous devons reproduire ce schéma *in vitro* dans un organisme entier. Cela nous permettra de comprendre les mécanismes physiologiques impliqués lors de traitement par les taxanes et les dérivés de platines et conduisant à ces neuropathies.

Dans ce projet constitué d'une seule procédure, l'objectif est d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles chez les patients, dans le but d'atténuer les neuropathies provoquées par des agents anticancéreux.

Pour des raisons éthiques, nous ne pouvons pas réaliser ces expériences chez l'homme. Nous avons choisi de le faire sur des modèles de souris de fond génétique C57Bl6. C'est un modèle bien documenté dans la littérature en ce qui concerne l'adaptation des protocoles de chimiothérapie utilisés chez l'homme.

Remplacement : Nos études *in vitro* ont déjà démontré que les dérivés de platine induisent une modification significative de l'expression de certains gènes impliqués dans la nociception. Cependant, à l'heure actuelle, aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement absolu à notre connaissance. Pour aller plus loin, nous devons à présent réaliser des injections intra-péritonéales de taxanes ou cisplatine chez la souris.

Réduction : Nous avons réduit le nombre d'animaux au minimum garantissant d'avoir des résultats statistiquement significatifs. Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les tests statistiques utilisés dans la bibliographie dans ce genre d'étude.

Raffinement : le but de notre procédure est d'induire une douleur chez nos animaux. Afin de ne soumettre nos animaux à aucune souffrance inutile, nous avons réfléchi à des points limites clairs, précis et adaptés à notre protocole de douleur. Tout au long de l'étude, nous observerons nos souris en nous appuyant sur des grilles de score. Ces grilles de score nous permettront de sortir les souris de l'étude lorsqu'un point limite sera atteint. Lorsque nous approcherons d'un point limite, nous mettrons en place une surveillance renforcée de nos animaux.

Nous utiliserons au total 88 souris pour l'ensemble de notre étude.

5477. Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent la première cause d'invalidité physique chez l'adulte et la troisième cause de décès à l'échelle nationale derrière l'infarctus du myocarde et les cancers. Les causes possibles de l'apparition d'AVC sont divers et comprennent : l'hypertension, les maladies artério-veineuses, l'hypercholestérolémie, les embolies pulmonaires ou encore la présence de tumeurs. Il s'agit d'une pathologie moderne du fait de l'augmentation de sa fréquence corrélée à notre mode de vie actuelle (alimentation, pollution, sédentarité, stress, tabac,...). L'organisation mondiale de la santé (OMS) considère les AVC en tant que pandémie et les prévisions pour 2030 annoncent près de 12 millions de morts victimes d'AVC.

L'AVC peut être classé en deux catégories selon son origine qui peut-être ischémique (80%) ou hémorragique (20%). Dans tous les cas de figure, il s'agit d'une perturbation vasculaire qui conduit à une mort neuronale massive dans le territoire cérébral irrigué par le vaisseau sanguin concerné. Les conséquences neurologiques délétères très souvent associées aux AVC ischémiques ne sont pas prises en charge. En effet, il n'existe aucun traitement curatif sur le plan neurologique à la suite d'un AVC ischémique de plus l'état de santé des patients nécessite un suivi médical important avec un coût élevé. Le traitement des AVC, notamment ischémiques, constitue donc un enjeu de santé public majeur sur le plan socio-économique.

Actuellement, le seul traitement reconnu et validé par l'OMS contre les AVC ischémiques, est l'utilisation de l'activateur tissulaire du plasminogène, connu sous le nom d'alteplase (t-PA), cette enzyme va provoquer la résorption du caillot sanguin et ainsi rétablir un flux sanguin cérébral physiologique. La thérapie cellulaire pourrait être utilisée en complément du t-PA pour le traitement des AVCs. Parmi les nombreux candidats cellulaires possibles, l'un d'entre eux semble particulièrement intéressant : les cellules souches olfactives (CSO). Ces dernières ont été largement décrites depuis le début du siècle et de nombreuses études ont mis en évidence leur rôle bénéfique dans différents modèles pathologiques.

De ce fait, nous nous proposons d'évaluer le potentiel thérapeutique des CSO dans un modèle rat d'amnésie induit par ischémie cérébrale globale (ICG). Afin de réaliser l'ICG, nous procéderons au modèle d'occlusion des quatre vaisseaux (4VO) puis nous réaliserons des acquisitions par imagerie afin d'évaluer l'efficacité des lésions. Les conséquences neurologiques du 4VO seront évaluées, avant et après greffes, au niveau comportemental grâce aux tests de discrimination olfactif associatif. Des tests de mémorisation spatiale seront également effectués en complément. Enfin, des analyses d'électrophysiologie et d'histologie seront effectuées dans le but d'étudier le devenir des CSO ainsi que leur impact sur les atteintes cérébrales.

Pour notre étude globale d'une durée totale de 3 ans selon les sous parties du projet, nous envisageons d'utiliser un nombre de 180 rats Sprague Dawley mâles (OFA) répartis en 3 groupes de 60 rats par an. La douleur, la souffrance et l'angoisse seront diminuées à leur maximum en utilisant des anesthésiques (local et général) et analgésiques appropriés suite aux différentes chirurgies. Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau jusqu'au jour de l'intervention à l'exception des périodes de comportement où une restriction hydrique aura lieu. Les animaux seront placés dans des conditions d'hébergement enrichis. Un délai minimum d'une semaine sera respecté entre la réception des rats et la date de la chirurgie. Comme de par le passé tout sera mis en œuvre pour réduire au minimum le nombre d'animaux et permettre d'appliquer aux résultats obtenus des comparaisons de moyenne (analyse de variance). Les lots d'animaux utilisés seront constitués, au minimum de huit rats.

5478. L'immunothérapie consiste à stimuler la réponse immunitaire des individus pour lui permettre de lutter contre les cellules cancéreuses. Elle constitue une avancée majeure dans le traitement du cancer mais les taux de réponses restent bas (10 à 57% selon les types de cancers et les traitements utilisés). Une protéine appelée interféron gamma (IFN γ) joue un rôle clef dans la réponse à l'immunothérapie. Nous avons conçu un traitement appelé DMBP5 capable de stimuler la production d'IFN γ par les cellules tumorales et donc de potentialiser les immunothérapies. Le traitement par DMBP5 dans des cellules de mélanome ou de cancers coliques ou pulmonaires entraîne la production par ces cellules d'IFN γ et attire et active les cellules immunitaires au sein des tumeurs. DMBP5, utilisé seul, réduit la taille des tumeurs sous-cutanées sans entraîner de toxicité chez la souris. Lorsqu'il est associé à un traitement par immunothérapie, il induit une diminution majeure de la taille des tumeurs avec une régression complète dans plusieurs cas.

Nous avons développé des composés dérivés de DMBP5 afin de potentialiser son efficacité et augmenter sa pénétration dans les tumeurs.

Afin d'avoir une approche plus physiologique et envisager ensuite ces traitements chez l'Homme, nous aimerions tester ces différentes molécules seules ou en association avec une immunothérapie sur des modèles de souris. Nous injecterons des cellules tumorales en sous-cutané pour évaluer l'effet des molécules sur la croissance des tumeurs de mélanome dans des souris C57Bl/6j possédant un système immunitaire complet. Après injection sous-cutané des tumeurs se développent systématiquement. Le traitement est débuté dès que les tumeurs sont mesurables (en général après 3 à 5 jours). Les souris sont sacrifiées lorsque la taille de la tumeur atteint 1cm³ (en général 2 à 3 semaines en l'absence de traitement). Des injections de cellules tumorales par voie veineuse seront également réalisées pour étudier l'effet des molécules sur développement de métastases. Les cellules tumorales ainsi injectées sont luminescentes et le développement des métastases (ce sont des métastases pulmonaires qui se développent majoritairement) sera suivi par une imagerie spécifique permettant d'arrêter l'expérience lorsque le développement des métastases est trop important (en général après 4 semaines environ). Des expériences similaires seront réalisées dans des souris Balb/c avec des cellules murines de cancer colique (CT26). Afin d'optimiser l'expérimentation (raffinement) ces modèles murins ont été choisis car ils sont le plus à même de pouvoir répondre sur l'efficacité des traitements évalués. Par ailleurs le protocole d'expérimentation a été soigneusement planifié. Le suivi est fait par des méthodes non invasives (mesure des tumeurs sous cutanées et surveillance par imagerie des métastases pulmonaires). Une anesthésie est prévue dès que cela est nécessaire (pour les imageries). Enfin des points limites devant conduire à l'euthanasie ont été définis. Ainsi, si les animaux ont une perte de poids (ne devra en aucun cas dépasser 10% du poids total de l'animal), un changement de comportement (souris isolée, agitée), ou toute modification physique pouvant entraîner une souffrance, l'animal sera euthanasié avant la fin de l'expérimentation. En termes de

remplacement, des études *in vitro* sont réalisées pour définir les concentrations optimales d'utilisation des différents composés avant de les utiliser chez la souris. Ces 2 modèles permettront d'évaluer l'efficacité des produits dans le traitement du mélanome et du cancer colique et serviront de base à une étude chez l'Homme. Nous espérons voir une régression des tumeurs et un allongement de la survie chez les souris traitées. Nous utiliserons le nombre d'animaux le plus restreint permettant l'analyse statistiques des résultats. D'autre part, tous les demandeurs sont titulaires d'une formation B, et les animaux seront observés quotidiennement afin de prendre en charge, précocement, tout signe de douleur, de stress ou d'inconfort. Nous utiliserons un total de 600 souris dans ce projet.

5479. Les molécules anticancéreuses utilisées actuellement en chimiothérapie sont efficaces mais les effets secondaires et les phénomènes de résistance développés par les patients démontrent que le besoin de nouvelles thérapeutiques est toujours insatisfait. Les candidats médicaments testés au cours de ce projet auront été préalablement sélectionnés par un panel de différents tests *in vitro*. Une fois qu'une molécule a démontré son efficacité sur un panel de cellules cancéreuses, il est indispensable d'évaluer ses effets *in vivo* sur des modèles animaux avant d'envisager son développement jusqu'à une évaluation clinique chez les humains. Nous proposons de tester les molécules sélectionnées sur des souris porteuses de tumeurs humaines (xénogreffes). Pour ce faire, des cellules cancéreuses seront injectées sous la peau des souris, qui en conséquence, développeront des tumeurs. L'évolution de la taille des tumeurs sous-cutanées sera suivie en présence ou en absence des molécules à tester et permettra d'évaluer l'efficacité des nouveaux traitements.

Le projet présenté ici respecte la règle des 3R :

Remplacer : Aucun modèle ne permet à ce jour d'évaluer l'efficacité de candidats médicaments sans le recours à l'expérimentation animale.

Réduire : Les tests réalisés sur un panel de cellules cancéreuses permettront de limiter au maximum le nombre de molécules testées *in vivo* et diminuerons ainsi le nombre d'animaux inclus dans la procédure (au maximum 960).

Raffiner : Les conditions d'hébergement des animaux seront optimales afin d'éviter tout stress. De plus, le poids des animaux et la taille des tumeurs seront suivis régulièrement afin d'assurer l'absence de souffrance excessive.

5480. Depuis 1985, la Thymoglobuline est enregistrée sous l'autorisation de mise sur le marché n°570 281-8 et est utilisée dans plus de soixante-dix pays.

Ce médicament est utilisé d'une part en prévention du rejet aigu de greffe avant transplantation et d'autre part en traitement du rejet aigu de greffe chez l'Homme

Selon l'INSERM, (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), l'augmentation des maladies chroniques et le vieillissement de la population se traduisent par un accroissement des indications de transplantation. Les besoins de Thymoglobuline sont donc réels et vont accroître.

Ce médicament est produit à partir de sérum de lapins.

Les lapins sont immunisés par l'injection de suspensions de cellules de thymus humains (soit 87 420 pour 5 ans).

Les anticorps produits sont prélevés par prises de sang pour servir à la fabrication de ce médicament.

Les lapins sont hébergés en binôme socialement harmonieux, et bénéficient d'eau et de nourriture à volonté ainsi que de jeux. La musique et la lumière sont basées sur leur rythme biologique.

5481. L'obésité et la consommation chronique d'alcool constituent les premières causes des maladies du foie en France et sont reconnues comme d'importants problèmes de santé publique. De plus, la proportion de patients obèses avec une consommation chronique d'alcool augmente dangereusement et pourrait développer plus rapidement des complications hépatiques sévères. Il est donc urgent de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans ces atteintes hépatiques (inflammation) et dans leur évolution vers des maladies gravissimes du foie (cirrhose et cancer du foie) afin de proposer des cibles thérapeutiques. Notre projet de recherche s'intéresse à la protéine adaptatrice intracellulaire 3BP2 (gène : Sh3bp2) qui est impliquée dans l'activation de programmes transcriptionnels dans les leucocytes au cours des réponses immunitaires. Des études récentes ont montré que 3BP2 participe à la réponse des macrophages aux stimuli infectieux (motifs moléculaires associés aux pathogènes, PAMP) via des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) pour déclencher une réaction inflammatoire permettant de contrôler l'infection. Dans un modèle de chéribisme chez la souris, la présence d'un allèle mutant de Sh3bp2 amplifie la réaction inflammatoire des macrophages aux pathogènes. L'inflammation joue un rôle important dans le développement et la sévérité des complications hépatiques et de nombreuses études ont mis en évidence l'implication de différentes composantes cellulaires du système immunitaire adaptatif (Lymphocytes T, B, NKT) et inné (macrophages, cellules dendritiques) dans l'installation d'une inflammation chronique. En particulier, les modifications phénotypiques et fonctionnelles des différents sous-types de macrophages hépatiques (macrophages résidents du foie (cellules de Küpffer) ou des macrophages recrutés à partir de la circulation peuvent conduire à une sévérité des complications hépatiques en augmentant l'inflammation, l'apoptose des hépatocytes et la fibrogénèse hépatique. Ainsi, des modifications de la régulation de 3BP2 au sein des cellules de la lignée myéloïde et/ou des hépatocytes localisés dans le foie pourraient altérer les fonctions de cet organe.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le rôle de la protéine 3BP2 au niveau du foie au cours des complications hépatiques liées à l'obésité et à la consommation d'alcool.

Ces procédures expérimentales sont nécessaires et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, des approches sur cellules isolées ne permettent pas de mimer la physiopathologie de ces maladies retrouvées chez l'homme. Nous utiliserons des souris sauvages et invalidées pour Sh3bp2 et il sera nécessaire de travailler sur l'organe entier de la souris en présence de tous les types cellulaires. Il est à noter que cette étude n'engendre aucune douleur sur l'animal induite par les traitements nécessaires pour le développement des complications induites par l'obésité et l'alcool (le foie est un organe non innervé). De plus, ces études seront réalisées dans le souci d'utiliser un nombre minimum d'animaux (990 animaux pour toutes les procédures) sans compromettre les objectifs du projet et en tenant compte des exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. De plus, leur bien-être sera scrupuleusement pris en compte dans toutes les procédures en termes de conditions d'élevage (température, hygrométrie), d'hébergement (présence de tige en coton et d'igloo dans les cages), et de soins afin de réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

5482. Actuellement, les dispositifs médicaux sont des produits de santé qui se développent fortement, avec des applications extrêmement variées.

Ils sont par définition, destinés à être mis en contact avec le corps humain. Par conséquent, ils constituent une source potentielle d'effets indésirables: allergies, réactions inflammatoires localisées ou généralisées, etc...

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques pour pouvoir obtenir le marquage CE permettant la mise sur le marché. L'utilisation d'animaux est à ce jour indispensable pour y parvenir intégralement. De même, il est indispensable d'évaluer l'efficacité de ces dispositifs, afin de s'assurer du bénéfice réel apporté au patient.

Les dispositifs médicaux sont répartis en quatre classes selon le risque croissant. La classe III recense les produits avec un risque potentiel très sérieux pour l'homme.

Le présent projet consiste à évaluer la performance et la tolérance locale de dispositifs médicaux de type III, formulés à base de biomatériaux injectables et résorbables.

Ces dispositifs peuvent être utilisés pour diverses applications: ophtalmologie, traitement de l'arthrose, cicatrisation, chirurgie réparatrice, etc...

L'évaluation se fera après injection sous-cutanée ou intradermique chez le Rat. Il est envisagé l'utilisation de 500 rats en 5 ans, pour l'évaluation d'au moins 10 dispositifs différents.

La durée d'implantation dépendra de la composition exacte des dispositifs médicaux et du champ d'application envisagé.

Tous les animaux feront l'objet de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de leur assurer un bien-être optimal tout au long des essais.

Les rats seront hébergés en groupes, en environnement enrichi.

La réduction du nombre d'animaux a été réalisée au maximum, tout en permettant au projet d'obtenir le nombre suffisant de données pour répondre à la problématique. Pour cela 2 à 4 produits pourront être implantés chez chaque rat.

Des procédures analgésiques, anesthésiques et des suivis cliniques ont été intégrés au protocole expérimental permettant de suivre et de prévenir tout signe de mal-être.

Des techniques d'imagerie seront mises en œuvre autant que possible afin de permettre le suivi longitudinal des produits, et ainsi de réduire encore le nombre d'animaux utilisés tout en raffinant le protocole.

Le bénéfice attendu est de pouvoir mettre sur le marché des dispositifs médicaux sûrs pour le patient, et dont les éventuels effets secondaires sont connus.

Ces études permettront en outre de vérifier que les produits ne sont pas dégradés trop rapidement par l'organisme, afin d'obtenir un effet à moyen terme.

5483. Tout au long de la vie, notre cerveau décide de la quantité de nourriture dont nous avons besoin pour garantir un niveau d'énergie suffisant à notre corps. Il communique avec le reste de l'organisme afin de connaître l'état des réserves disponibles pour fonctionner, notamment par le biais d'hormones, ou en détectant le taux de nutriments qui circulent dans le sang (glucides, lipides). Les lipides alimentaires sont des nutriments capables de pénétrer dans le cerveau, et d'indiquer à certaines zones en charge de contrôler la sensation de faim s'il est nécessaire de manger plus, ou au contraire de jeûner. Chez les individus obèses, l'augmentation du poids s'accompagne souvent d'une augmentation du taux de lipides dans le sang, qui perturbe la signalisation utilisée par le cerveau pour réguler la balance énergétique. De plus, la sensation de plaisir et de récompense, régulée par la libération de dopamine dans le cerveau, ne fonctionne pas correctement. Or, la sensation de plaisir associée à la nourriture est une composante très importante dans le contrôle de l'appétit, et décide en grande partie de si nous allons manger quelque chose ou non. Ces observations suggèrent qu'en plus d'avoir un impact sur la régulation de la balance énergétique par le cerveau, les lipides pourraient également affecter la composante hédonique, et ainsi perturber la régulation de la prise alimentaire.

Afin d'étudier le rôle de la signalisation des lipides dans le cerveau, nous souhaitons utiliser un modèle animal grâce auquel nous pouvons apporter des lipides spécifiquement au cerveau, sans toucher les autres organes. Nous étudions l'effet d'une perfusion de lipides depuis la carotide vers le cerveau sur le comportement alimentaire, le métabolisme et sur la perception de la récompense et du plaisir chez des souris de laboratoire. Nos études touchent à la communication entre organes et s'appuient sur du comportement, aussi il n'est actuellement pas possible de remplacer ce type de protocoles par des modèles informatiques. Des études ont montré que la perception de lipides par le cerveau entraîne une baisse de motivation, une diminution de l'activité physique et une préférence plus marquée pour les aliments sucrés et gras, ce qui pourrait expliquer la prise de poids observée chez certains patients.

Nous souhaitons comprendre quels sont les cellules du cerveau qui sont responsables des changements de motivationnels induits par les lipides. Nous voulons étudier les cellules en charge du soutien et de la nutrition des neurones, appelées les astrocytes. Grâce à des outils génétiques, nous sommes capables d'activer ou d'inactiver le métabolisme des astrocytes, et nous souhaitons voir dans quelle mesure des modifications spécifiques des astrocytes altèrent le comportement alimentaire des animaux lorsqu'elles sont couplées avec une administration de lipides spécifiquement au cerveau.

Nous proposons un projet où nous utiliserons des souris dont les astrocytes expriment des récepteurs spécifiquement activables lorsque l'animal reçoit un ligand non toxique, le Clozapine-N-oxide. Nous étudierons comment l'activation spécifique de certains astrocytes permettra de moduler les baisses de motivation.

Nous veillerons à l'application de la règle des 3 R, et nous remplacerons dès qu'il sera possible l'utilisation du modèle animal par des méthodes alternatives (culture cellulaire en particulier). Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Enfin, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux employés pour notre étude en employant le nombre le plus petit d'animaux pour avoir des résultats statistiquement exploitables, et nous effectuerons des protocoles les moins invasifs possibles. Nous utiliserons 130 souris dans ce projet.

5484. Tout au long de la vie, notre cerveau décide de la quantité de nourriture dont nous avons besoin pour garantir un niveau d'énergie suffisant à notre corps. Il communique avec le reste de l'organisme afin de connaître l'état des réserves disponibles pour fonctionner, notamment par le biais d'hormones, ou en détectant le taux de nutriments qui circulent dans le sang (glucides, lipides). Les lipides sont des nutriments contenus dans la matière grasse. Ils sont capables de pénétrer dans le cerveau, et d'indiquer à certaines zones en charge de contrôler la sensation de faim s'il est nécessaire de manger plus, ou au contraire de jeûner.

Chez les individus obèses, l'augmentation du poids s'accompagne souvent d'une augmentation du taux de lipides dans le sang, qui perturbe la signalisation utilisée par le cerveau pour réguler la balance énergétique. De nombreuses études montrent que chez les individus obèses ou chez des animaux mis sous régime gras, la sensation de plaisir et de récompense, régulée par la libération de dopamine dans le cerveau, ne fonctionne pas correctement. Or, la sensation de plaisir associée à la nourriture est une composante très importante dans le contrôle de l'appétit, et décide en grande partie de si nous allons manger quelque chose ou non.

Ces observations suggèrent qu'en plus d'avoir un impact sur la régulation de la balance énergétique par le cerveau, les lipides pourraient également affecter la composante hédonique, et ainsi perturber la régulation de la prise alimentaire.

Afin d'étudier le rôle de la signalisation des lipides dans le cerveau, le laboratoire a développé un modèle grâce auquel nous pouvons apporter des lipides spécifiquement au cerveau, sans toucher les autres organes. Nous étudions l'effet d'une perfusion de lipides vers le cerveau sur le comportement alimentaire, le métabolisme et sur la perception de la récompense et du plaisir chez des souris de laboratoire. Nos études touchent à la communication entre organes et s'appuient sur du comportement, aussi il n'est actuellement pas possible de remplacer ce type de protocoles par des modèles informatiques.

Nous veillerons à l'application de la règle des 3 R, et nous remplacerons dès qu'il sera possible l'utilisation du modèle animal par des méthodes alternatives (culture cellulaire en particulier). Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Enfin, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux employés pour notre étude en employant le nombre le plus petit d'animaux pour avoir des résultats statistiquement exploitables, et nous effectuerons des protocoles les moins invasifs possibles. Nous utiliserons 320 animaux sur la durée totale du projet.

5485. La dermatite atopique, encore appelée eczéma atopique, est une des maladies les plus fréquentes de l'enfant qui peut apparaître dès les premiers mois de la vie.

C'est une maladie inflammatoire chronique de la peau. Elle débute le plus souvent vers l'âge de trois mois, mais peut également s'observer dès les premiers jours de la vie. Chez le nourrisson les lésions de la peau s'observent sur les joues et le menton, les cuisses, les bras et l'abdomen.

Les lésions évoluent progressivement ou simultanément sous la forme de rougeurs, de démangeaisons, de vésicules puis de croûtes.

L'origine de cette pathologie est principalement allergique.

Il n'existe pas de traitement curatif efficace à ce jour. Les traitements utilisés sont symptomatiques et permettent de réduire les signes cliniques.

Il est donc important d'avoir un modèle préclinique pertinent permettant de tester l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques. Il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

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

- Ces modèles *in vitro* ne permettent pas de tester des produits thérapeutiques ou des dispositifs médicaux destinés à être appliqués sur la peau (voie dermique / topique)

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

Ce projet s'effectuera chez la souris (*Mus musculus*) et la rat (*Rattus norvegicus*).

Il est prévu d'utiliser 2100 souris et 900 rats sur une période de 5 ans pour permettre l'évaluation de l'efficacité de molécules pharmaceutiques ayant une indication thérapeutique dans le traitement la dermatite atopique.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : Le modèle animal de dermatite atopique ne sera utilisé qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.
- Réduction des animaux: Le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 8 animaux par groupe. De plus, le projet inclut une procédure incluant une évaluation en imagerie non invasive de la dermatite atopique afin d'appliquer un suivi longitudinal au niveau cellulaire de la pathologie dans de futurs projets.
- Raffinement : Evaluation de points finaux tous les jours (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites), enrichissement du milieu dans les cages et utilisation de techniques d'imagerie innovantes.

5486. Tout au long de la vie, notre cerveau décide de la quantité de nourriture dont nous avons besoin pour garantir un niveau d'énergie suffisant à notre corps et maintenir un poids corporel constant. Il communique avec le reste de l'organisme afin de connaître l'état des réserves disponibles pour fonctionner, notamment par le biais d'hormones, ou en détectant le taux de nutriments qui circulent dans le sang (glucides, lipides).

Les lipides alimentaires sont capables de pénétrer dans le cerveau et d'informer le cerveau des besoins alimentaires.

Chez l'homme comme chez l'animal une perturbation des mécanismes de régulation du poids dans le cerveau sont à l'origine de comportements boulimiques et/ou anorexique et peuvent conduire à une prise ou une perte de poids (obésité). Le taux de lipides circulant chez l'obèse est très haut et nous savons qu'ils peuvent directement agir sur les parties du cerveau qui contrôlent le plaisir associé à la nourriture et qu'une dérégulation de ce processus conduit à une consommation trop importante de nourriture.

Au sein du cerveau les lipides pourraient agir sur les neurones d'une part mais aussi sur les cellules accessoires du cerveau. Chez l'homme il existe une mutation génétique appelée TaqAI qui affecte 40% de la population et qui conduit à une forte augmentation de la susceptibilité à développer un comportement alimentaire boulimique et excessif. Cette mutation affecte le gène codant pour la protéine Ankk1 et nous avons observé que chez l'homme portant cette mutation les mécanismes de détection centraux des lipides semblent perturbés indiquant un rôle probable de cette protéine dans ces processus.

Nous souhaitons travailler sur un modèle animal permettant d'invalider la protéine Ankk1 chez la souris, et voir dans quelle mesure ce polymorphisme est impliqué dans la détection des lipides par le cerveau et dans la régulation du comportement alimentaire.

Nous veillerons à l'application de la règle des 3 R, et nous remplacerons dès qu'il sera possible l'utilisation du modèle animal par des méthodes alternatives (culture cellulaire en particulier). Dans un souci de raffinement, nous veillerons en continu au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement. Enfin, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux employés pour notre étude en employant le nombre le plus petit d'animaux pour avoir des résultats statistiquement exploitables, et nous effectuerons des protocoles les moins invasifs possibles. Nous utiliserons 260 animaux sur une période de 5 ans.

5487. La recherche et le développement de nouveaux médicaments impliquent plusieurs étapes, depuis la découverte de molécules potentiellement thérapeutiques (« drug discovery ») jusqu'à la mise sur le marché d'un médicament. La première étape consiste en une sélection (« screening ») de molécules d'intérêt, qui devront ensuite être testées *in vitro* sur des cultures cellulaires puis nécessairement *in vivo* chez des animaux vivants avant d'être testées en clinique chez l'Homme.

Les tests *in vivo* visent à caractériser les effets et le comportement de molécules candidates après administration chez l'animal.

Ce projet vise à évaluer l'effet de molécules sur les vaisseaux sanguins (vasodilatation/vasoconstriction). Pour cela, nous utiliserons l'imagerie laser doppler qui consiste en une technique d'imagerie non invasive permettant d'évaluer le flux sanguin sous la peau. Il s'effectuera chez la souris (*Mus musculus*) et chez le rat (*Rattus norvegicus*).

Sur une période de 5 ans, il est prévu d'utiliser 400 souris et 200 rats pour l'évaluation de l'effet vasoconstricteur de nouvelles molécules thérapeutiques.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : l'utilisation des animaux ne se fera qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité *in vitro*.
- Réduction des animaux : le design de l'étude est un plan d'expérience contrôlé, c'est à dire que chaque paramètre est optimisé de façon à ce que le nombre d'animaux soit réduit à son minimum pour chaque groupe.
- Raffinement : le projet utilise une approche d'imagerie non invasive (imagerie laser doppler). Les examens d'imagerie se feront sous anesthésie gazeuse. De plus, une évaluation régulière de points limites (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal), et un enrichissement du milieu dans les cages seront réalisés.

5488. L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque cardio-vasculaire qui se trouve fortement augmenté chez les patients diabétiques et obèses. Ce projet s'inscrit dans une étude visant à analyser les troubles alimentaires et de l'homéostasie glucidique liés à l'hyperhomocystéinémie. Des souris « modèle d'hyperhomocystéinémie », c'est-à-dire qui portent une mutation sur le gène de la Cystathionine Beta Synthase (CBS), sous-alimentation standard présentent une prise de poids corporel plus forte que celle des souris témoins sauvages. C'est pourquoi nous proposons de caractériser le comportement alimentaire et les perturbations métaboliques de ces souris. Notre étude nécessitera 40 souris au total : 2 groupes de 20 souris, car l'étude statistique utilisée pour chaque expérience nécessite 10 souris par groupe. De plus, les différentes expérimentations pourront être effectuées sur des mêmes groupes de souris dans la mesure où celles-ci se révèlent non invasives, non douloureuses et non stressantes pour l'animal.

Une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R : réduire le nombre d'animaux comme expliqué précédemment, remplacer par des approches *in vitro* dès que cela est possible et « raffiner » les approches expérimentales... De plus les animaux seront surveillés de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité.

5489. L'objectif de ce projet est de développer de nouveaux produits antiparasitaires (ou parasitocides) vétérinaires afin d'améliorer la santé des animaux de compagnie (chiens, chats, chevaux) et des animaux destinés aux marchés alimentaires (bovins, ovins, caprins, poules, porcs).

Pour mener à bien le développement de ces nouveaux produits, l'innocuité et l'efficacité seront évaluées sur les espèces cibles conformément aux exigences réglementaires, dont les principales sont décrites dans les directives WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology), VICH (Veterinary International Conference on Harmonization) et EMA (European Medicines Agency).

Afin de réduire au maximum l'utilisation de l'animal, une première sélection de molécules parasitocides sera effectuée *in vitro*, par contact direct avec des parasites semblables aux parasites affectant les animaux cibles.

Une seconde étape de sélection peut être effectuée *in vivo* sur des rongeurs porteurs de parasites identiques à ceux de l'espèce cible, afin d'affiner la sélection et ainsi réduire le nombre d'animaux cibles utilisés au final. Une telle étude sera menée sur 4 à 5 rongeurs par groupe, avec typiquement 4 à 5 groupes par étude. Aucune douleur, souffrance ou angoisse n'est attendue ni tolérée. Finalement, l'innocuité et l'efficacité du produit sélectionné seront évaluées chez l'animal cible dans le cadre d'études réglementaires.

Les études d'innocuité requièrent 2 à 4 groupes de 8 animaux. Des effets secondaires sont possibles à haute dose (plafonnée à 5X). Afin de réduire au maximum les troubles, les animaux sont suivis plusieurs fois par jour par les mêmes opérateurs hautement qualifiés dans les soins à l'espèce traitée. Les soins vétérinaires sont autorisés.

Le développement de tout produit qui provoquerait des effets secondaires modérés sera stoppé dès les premiers signes.

Les études d'efficacité, sont basées sur des comparaisons de niveaux d'infestation chez des animaux traités et non traités (groupe contrôle).

Les réglementations imposent pour le groupe contrôle un minimum de 6 animaux avec un niveau d'infestation défini. De ce fait, le nombre d'animaux utilisés (6 à 12) dans chaque groupe est lié à la probabilité d'obtenir ce niveau d'infestation, qui dépend du parasite étudié. Les connaissances de modèles animaux (études précédentes) et la littérature scientifique permettent d'évaluer cette probabilité.

Pour les études ectoparasites (parasites externes), les infestations peuvent parfois provoquer de l'inconfort chez l'animal du groupe contrôle (démangeaisons, dermatite). Un examen sanitaire régulier des animaux sera pratiqué. Le retrait de l'étude ou un traitement concomitant durant l'étude sera effectué.

Pour les études endoparasites (parasites internes), les symptômes dus aux infestations sont très rares car les animaux sont parasités sur une période courte durant laquelle les symptômes n'ont pas le temps d'apparaître (en conditions naturelles les parasites internes provoquent parfois des symptômes cliniques en conditions chroniques, quand l'hôte est parasité depuis longtemps).

Sur l'ensemble du projet et sur une durée de 5 ans, jusqu'à 400 rongeurs, 900 chiens, 900 chats, 180 chevaux, 180 ovins, 180 caprins, 180 porcs, 180 poules pourront être utilisés en fonction des produits antiparasitaires à développer.

5490. La fièvre aphteuse est une maladie virale non dangereuse pour l'homme qui affecte principalement les animaux ongulés (mammifères herbivores dotés de sabots). Très contagieuse, elle reste l'une des préoccupations majeures des éleveurs et des autorités sanitaires et peut avoir des répercussions socio-économiques considérables. A titre d'exemple, la réapparition de la fièvre aphteuse en Europe en 2001, qui a touché plus particulièrement le Royaume Uni dont 2000 exploitations ont été frappées, restera parmi les exemples les plus dévastateurs de l'histoire. A la même année, deux foyers ont été identifiés en France ce qui a entraîné l'abattage de près de 50 000 animaux et des conséquences économiques importantes. En effet, les mesures de lutte contre la fièvre aphteuse qui ont conduit à l'abattage d'urgence des troupeaux infectés, les restrictions imposées aux échanges communautaires ainsi que les impacts indirects de l'épidémie sur l'environnement et le tourisme dans les régions touchées eurent un coût élevé pour l'ensemble de la Communauté.

Devant cette menace, une stratégie de lutte internationale a été initiée en 2009 par l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) dans le cadre du Plan-cadre mondial pour la lutte progressive contre les maladies animales transfrontalières signé par les deux partenaires en 2004. Cette stratégie de lutte mondiale contre la fièvre aphteuse est considérée comme une priorité internationale.

La vaccination est la méthode de choix pour contrôler et/ou prévenir les infections par le virus de la fièvre aphteuse. Des vaccins inactivés sont disponibles mais leur durée d'efficacité est limitée dans le temps. De plus, la production de vaccins inactivés nécessite de disposer de grandes quantités de virus infectieux pour leur formulation, ce qui représente un problème majeur de sûreté biologique. Afin de proposer une solution à ces problèmes, de nouvelles approches vaccinales sont à l'étude dont l'utilisation d'adénovirus recombinés exprimant des antigènes du virus de la fièvre aphteuse.

Les objectifs principaux de cette étude sont (i) de mesurer sur une période de 18 mois la durée d'immunité induite par différentes formulations vaccinales : le vaccin inactivé commercial et un vaccin innovant à base d'adénovirus recombiné avec et sans adjuvant et (ii) d'analyser les profils d'expression génique dans les cellules mononuclées du sang périphérique où les réponses immunitaires sont initiées. Soixante moutons (30 animaux ajoutés aux 30 animaux de la 1ère partie) seront vaccinés à l'aide des différentes formulations (20 animaux par vaccin) et des prélèvements de sang seront régulièrement réalisés pour mesurer la durée

de l'immunité. Les profils d'expression génique seront établis à partir de cellules sanguines prélevées au cours des premiers jours après la vaccination.

Les profils d'expression génique qui ont été caractérisés dans les cellules sanguines au cours de la réponse précoce aux vaccins chez l'homme et les rongeurs, sont prédictifs de l'amplitude de la réponse humorale. Nous émettons l'hypothèse que cette régulation de l'expression de gènes serait également prédictive de la durée de l'immunité et fournirait un outil puissant et innovant pour sélectionner efficacement les nouvelles stratégies vaccinales induisant une longue durée de l'immunité protectrice.

Remplacement: l'animal sensible au virus de la fièvre aphteuse, ici le petit ruminant, est nécessaire pour l'évaluation de la durée de l'immunité vaccinale et l'établissement du profil d'expression génique précoce; Le remplacement n'est donc pas possible.

Réduction: le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum afin d'obtenir des résultats interprétables et exploitables scientifiquement à partir de l'analyse des données brutes du transcriptome précoce associé aux réponses immunes

Raffinement: les animaux seront maintenus en groupe, après une période d'hébergement en confinement de deux à trois semaines nécessaires à la vaccination avec un adénovirus recombinant, les animaux seront hébergés en condition conventionnelle sur paille.

5491. Contexte :

Les autorités de santé demandent la démonstration de l'innocuité, de l'activité, de l'inactivation et de la pureté d'un vaccin via des contrôles qualité qui ont pour finalité l'autorisation de mise sur le marché (AMM). La réalisation de certains de ces tests *in vitro* implique l'utilisation d'animaux pour produire les réactifs (sérums spécifiques).

Objectifs :

Ce projet a pour objectif d'être en adéquation avec les exigences réglementaires du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les études ont pour but de produire des réactifs nécessaires aux laboratoires pour effectuer et valider les tests *in vitro*, et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés dans les procédures de contrôles qualité ayant pour but la libération d'un lot de vaccins.

Dommages/avantages :

Certains animaux montrent des symptômes liés à la souche virale injectée qui peut induire une douleur. Une légère augmentation du stress due aux injections et aux manipulations peut apparaître.

Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent.

Cette étude contribue à vérifier la qualité du produit pour les animaux et leur environnement.

Ces tests permettent la libération de vaccins qui protègent efficacement les animaux contre les maladies infectieuses, améliorent directement la qualité sanitaire des élevages et assurent un meilleur bien-être animal.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccin sur le marché de l'élevage, jusqu'à 80 poulets seront nécessaires sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : la production de sérums hyper immuns n'est possible qu'*in vivo*, il n'existe pas de méthode alternative *in vitro* pour produire ces sérums.

Réduction : le nombre d'animaux est directement lié à la quantité de réactifs nécessaires à la réalisation de tests *in vitro* qui ont été développés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les procédures de contrôles qualité ayant pour but la libération d'un lot de vaccins.

Raffinement : Des points limites spécifiques à la pathologie sont déterminés et appliqués. Le personnel vérifie l'évolution de l'état général et si les points limites spécifiques sont atteints.

Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements du milieu ont été mis en place dans les hébergements.

5492. Avec plus de 80% de la mortalité cardiovasculaire survenant chez les individus de plus de 65 ans, le vieillissement est un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires. Il est à noter que l'hypertension artérielle, la rigidité artérielle et l'hypercoagulabilité (la coagulation exagérée) augmentent avec l'âge pouvant entraîner des complications telles que l'athérosclérose et l'accident vasculaire cérébral. Il est donc crucial de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le vieillissement artériel physiologique (normal) ou physiopathologique (lors des maladies suscitées). Plus particulièrement, nous recherchons à identifier des mécanismes centraux qui font le lien entre le développement de la rigidité artérielle et l'hypercoagulabilité au cours du vieillissement. Pour cela, nous nous focaliseront sur certaines protéines de la famille des « petites protéines G » (RhoA et son facteur d'activation Arhgef1 ainsi que Rac1) exprimées dans les cellules composant la paroi artérielle (cellules musculaires lisses et cellules endothéliales) et les plaquettes sanguines. Elles assurent la transmission d'informations captées par des récepteurs membranaires (comme récepteur de la thrombine PAR) à l'intérieur de la cellule (la transduction du signal). Elles sont impliquées dans des événements cellulaires très importants tels que la prolifération, l'adhérence des cellules à la matrice, la régulation du phénotype cellulaire, qui lorsqu'ils sont dérégulés peuvent être impliqués dans des pathologies. Nous utiliserons plusieurs lignées de souris transgéniques qui n'expriment plus soit Arhgef1, soit Rac1 seulement dans les cellules musculaires lisses en comparaison avec les souris contrôles. Les conséquences *in vivo* de l'absence de ces facteurs seront évaluées sur la morphologie, les propriétés mécaniques artérielles et la coagulation sanguine. Ce travail sera complété par une étude *in vitro* en utilisant des lignées cellulaires humaines de la paroi artérielle commercialisées pour limiter l'utilisation des animaux pour étudier les voies de signalisation dépendantes de Arhgef1 et de rac1 à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. En perspective, si nos résultats montrent une implication de ces molécules dans la rigidité artérielle et

l'hypercoagulabilité, des inhibiteurs spécifiques seront développés pour contrebalancer ou prévenir des maladies liées au vieillissement vasculaire.

Il est prévu d'utiliser 360 souris au total en tenant compte des études *in vivo* et *in vitro*. Dans le cadre du respect des 3 R :

- Afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs types de mesures seront effectuées sur un même animal en traitant la douleur si nécessaire par injection sous-cutané de buprénorphine, 10 min avant la procédure. Toutes les expériences invasives se feront sous anesthésie gazeuse (isoflurane). De plus, notre expertise nous permet de limiter à 10 animaux par groupes et des tests statistiques non paramétriques adaptés pour des petits effectifs seront utilisés pour analyser les données.

- Durant le temps de vie des animaux, si 3 ou plus de ces points limites sont observés, l'animal sera mis à mort : à savoir une perte de poids de 10 à 15% sur 3 jours, un Isolement, des yeux fermés, un dos voûté, le poil hérissé, une Immobilité, une déshydratation, une température corporelle anormale des yeux et un abdomen creux, une automutilation

- Pour le raffinement, les animaux ne seront pas manipulés dans la même pièce que celle où ils sont hébergés. Les souris seront hébergées de 1 à 5 par cages individuellement ventilées. Elles seront nourries *ad libitum* avec les croquettes. La litière sera changée une fois par semaine. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et bâtonnets de bois.

5493. La septicémie, principale cause d'admission dans les unités de soins intensifs, est caractérisée par une réponse inflammatoire générale résultant d'une infection non contrôlée.

En dépit de la mise en œuvre des directives internationales, des progrès médicaux constants et des milliards dépensés chaque année, la plupart des mécanismes impliqués dans la progression de cette infection sont encore aujourd'hui mal compris.

Cependant, des données récentes ont permis d'émettre l'hypothèse qu'un excès de stimulation adrénergique pouvait expliquer le déséquilibre du système immunitaire à l'origine de la réponse inflammatoire exagérée.

Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous souhaitons tester les effets de β 1-bloquants adrénergiques chez des souris septiques. Pour cela, nous serons amenés à employer deux modèles de sepsis internationalement reconnus, le modèle par péritonite (CLP) et le modèle par administration de lipopolysaccharide (LPS). Les β 1-bloquants testés seront l'Aténolol et l'Esmolol et les souris seront réparties en 12 groupes (Contrôle, Contrôle-Aténolol, Contrôle-Esmolol, LPS, LPS-Aténolol, LPS-Esmolol, sham, sham-Aténolol, Sham-Esmolol, CLP, CLP-Aténolol, CLP-Esmolol).

L'utilisation d'animaux, dans cette étude, est dictée par la complexité de cette pathologie touchant plusieurs organes simultanément. L'effet ne peut donc être considéré qu'à l'échelle d'un organisme. De plus, il existe une bonne corrélation entre les données obtenues chez les souris (en cas de synergie des résultats du modèle LPS et du modèle CLP) et l'homme au cours du sepsis.

Pour limiter le nombre d'animaux, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire, sur une analyse bibliographique poussée de cette pathologie et une optimisation des prélèvements (sang, cœur, foie, reins, poumons, surrénales, muscles squelettiques) effectués après euthanasie sur chaque animal. Nous nous sommes également limités à l'utilisation de deux traitements potentiels (couramment employés chez l'homme), qui en cas de résultats positifs et complémentaires permettront d'envisager une étude clinique de phase II chez l'homme (réduction).

Une attention particulière sera portée au bien-être animal à travers un suivi régulier des souris et ce afin de déceler tout excès de douleur, ce qui introduirait un biais dans nos recherches. Ce suivi a été planifié selon les critères définis dans le document ci-après et reconnu au niveau international (raffinement).

Au total, nous serons amenés à utiliser 450 souris pour cette étude.

5494. Contexte. La technologie des ultrasons thérapeutiques, connue par l'acronyme HIFU (High intensity focused ultrasound) permet d'effectuer l'ablation de tissus pathologiques d'une manière totalement non invasive. Une sonde émet des ultrasons qui traversent la peau et se concentrent sur le tissu à traiter, provoquant la nécrose de coagulation des tissus ciblés. La sonde comporte aussi une barrette d'échographie qui permet de guider en permanence le geste. L'échothérapie est déjà utilisée en routine pour traiter notamment les cancers de la prostate et les fibromes utérins. De nombreuses autres applications cliniques sont en développement. Le dispositif utilisé dans cette étude permet de traiter les adénofibromes du sein et les nodules thyroïdiens.

Les avantages comparatifs du dispositif concernent aussi bien le patient, les praticiens et les centres de traitement que la collectivité. Pour le patient, les avantages se traduisent par des durées d'intervention chirurgicale et d'hospitalisation réduites, par l'amélioration de la qualité de vie post opératoire (absence de cicatrice, durée d'hospitalisation faible, douleurs moindres...). Pour les praticiens et les centres de traitement, les avantages du dispositif se caractérisent par l'augmentation du nombre de patients traités, la possibilité d'adresser différentes pathologies via un dispositif unique et la sécurité, l'efficacité et la facilité d'utilisation. Pour la collectivité, les avantages comparatifs sont d'ordre économique et se traduisent notamment par la réduction des coûts induits par les traitements médicamenteux longs ou les actes chirurgicaux (la durée d'hospitalisation, notamment).

Objectif général. L'objectif de l'étude est de faire évoluer la technologie de l'échothérapie en proposant de nouvelles procédures de traitement qui mettent chacune en œuvre un mode différent d'application de l'énergie ultrasonore. Les objectifs majeurs de l'étude sont l'amélioration 1) de l'efficacité, 2) de la gestion de la douleur, 3) de la couverture de traitement (rendra possible l'ablation complète des cibles cliniques) et 4) du temps de traitement. D'autre part, une analyse de l'impact cutané est systématiquement réalisée après un traitement HIFU. L'innocuité du traitement HIFU sur les tissus cutanés fait partie de la validation d'une procédure de traitement. De plus, pour certains modes d'exposition, l'enregistrement des signaux ultrasonores réfléchis permettra d'évaluer l'efficacité d'une méthode de feedback continu permettant une amélioration de la maîtrise des lésions engendrées.

Modèle animal et méthode. Le modèle animal *in vivo* est nécessaire car cela permet de prendre en compte la vascularisation et la présence de la paroi cutanée. Le foie de porc, traité par ultrasons thérapeutiques par voie externe, est un modèle animal connu des expérimentateurs. Dans toute l'expérience clinique avec l'échothérapie aucune douleur post traitement n'a été observée chez les patients (prostate, thyroïde, vessie). De plus aucune infection n'est à craindre compte tenu du caractère extracorporel du traitement. Les porcelets seront anesthésiés et on appliquera l'énergie ultrasonore sur le foie par voie externe, sous-costale. Les animaux seront maintenus sous anesthésie tout au long des traitements HIFU et jusqu'à l'euthanasie qui interviendra au maximum dans l'heure suivant le dernier traitement délivré. La portion de foie traitée sera prélevée pour analyse macroscopique et histologique. De nouveaux modes d'application de l'énergie ultrasonore seront évalués grâce à une analyse macroscopique des lésions tissulaires qu'ils engendrent. D'une part, on évaluera le gain de temps de traitement. D'autre part, on étudiera la morphologie et les dimensions des tissus coagulés par HIFU, pour évaluer la couverture spatiale, la reproductibilité des lésions tissulaires et la précision du traitement. Soixante-quinze porcelets seront nécessaires à la réalisation de l'étude.

5495. Les troubles anxieux sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, il est estimé que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, les états anxieux sont impliqués dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France. L'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés pour traitement de l'anxiété nécessite d'observer le comportement animal dans des conditions adéquates.

Le test de la boîte claire-obscur est l'un des modèles d'évaluation de l'anxiété les plus utilisés chez la Souris. Il présente l'avantage majeur d'être sensible à de nombreux types de molécules utilisées en clinique humaine. Sa sensibilité aux molécules pharmacologiques telle que la Buspirone en plus des anxiolytiques plus classiques comme les benzodiazépines, rend ce modèle très pertinent pour l'évaluation des effets anxiolytiques des molécules en cours de développement. L'utilisation d'animaux est nécessaire pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests *in vitro* ou *in silico*) (remplacement).

Ce test est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour la lumière.

Le dispositif expérimental est composé de 2 compartiments juxtaposés, le compartiment clair aux parois blanches qui est ouvert, et le compartiment sombre aux parois noires qui est fermé. Une ouverture dans la cloison centrale permet le passage de l'animal d'un compartiment à l'autre. Au cours du test l'animal peut explorer librement le dispositif pendant 5 minutes. Dans cette situation, le compartiment clair induit un état d'anxiété plus important pour l'animal que le compartiment sombre, on dit qu'il est plus anxiogène. Le niveau d'anxiété sera évalué par la comparaison entre le temps passé dans chacun des compartiments, le nombre de transitions entre les compartiments ainsi que la distance parcourue. Ainsi par exemple plus un animal sera anxieux plus il passera de temps dans le compartiment sombre ; en revanche l'administration d'un traitement anxiolytique devrait permettre aux animaux de diminuer le temps passé dans le comportement sombre au profit du compartiment clair.

L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité anxiolytique de produits fournis par nos clients. Ce projet portera sur 3 ans, au cours desquels, nous testerons au maximum 80 Composés-Doses ; nous testerons ainsi un composé à une dose par groupe expérimental. Nous reproduirons le schéma expérimental ci-dessous au maximum 20 fois sur la période de 3 ans.

Un lot expérimental sera composé de 6 groupes expérimentaux, comprenant chacun 12 animaux comme suit :

Groupe 1 : Véhicule

Groupe 2 : Anxiolytique de référence (Diazépam ou Buspirone)

Groupe 3 : Composé-Dose 1

Groupe 4 : Composé-Dose 2

Groupe 5 : Composé-Dose 3

Groupe 6 : Composé-Dose 4

Ce projet nécessitera un maximum de 1440 souris, de souche C57BL/6J ou CD-1 IGS et âgées de 3 semaines à réception.

Les produits seront administrés par voie orale.

Pour un lot expérimental, les 72 souris seront prétraitées par voie orale pendant 3 jours avant la réalisation du test et traités le jour du test avec le véhicule des composés-dose, la référence pharmacologique (Diazépam ou Buspirone) ou les composés-dose une heure avant leur passage dans le test de la boîte clair-obscur (procédure 1). Les animaux seront placés à jeun pour la réalisation du test (procédure 2). Le test de la boîte clair-obscur sera effectué pendant 5 minutes pour chaque souris comme décrit précédemment (procédure 3).

Les animaux seront hébergés à 2 par cage avec un enrichissement du milieu (feuille de papier absorbant). Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum ou de 15% cumulés sur 3 jours consécutifs, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entrainera la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement).

A la fin des expérimentations, les animaux seront mis à mort si une réutilisation ne peut être envisagée.

5496. En cas d'émergence d'une maladie nouvelle chez les volailles, les mesures de protection pourraient faire appel à une vaccination d'urgence. Dans ce cas, les vaccins pourraient être utilisés hors Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Il pourrait s'agir de vaccins déjà existants contre l'agent infectieux identifié, mais n'ayant pas d'AMM pour l'espèce concernée ou n'ayant pas d'AMM en France. Il pourrait également s'agir d'une souche de l'agent pathogène possédée par un laboratoire qui

serait également utilisée comme vaccin hors AMM. Dans tous ces cas, un contrôle d'innocuité et d'efficacité pour l'espèce concernée devrait être réalisé en urgence avant l'utilisation sur le terrain.

Le contrôle d'innocuité vise à détecter des problèmes cliniques pouvant survenir suite à la vaccination et à vérifier que le vaccin testé n'induit pas des anticorps vis-à-vis d'autres agents infectieux connus chez les volailles concernées. Le contrôle d'efficacité vise à contrôler si le vaccin confère une protection clinique aux animaux vis-à-vis d'une épreuve infectieuse.

L'objectif de ce projet est la mise en œuvre d'un contrôle d'innocuité et d'efficacité de vaccin sur volailles (poule, dinde ou canard de Barbarie) exemptes d'organisme pathogènes spécifiés ou sur des volailles conventionnelles pouvant appartenir à différentes espèces domestiques (notamment poule, dinde, canards de différentes espèces, oie, pintade, pigeon, espèces de gibier d'élevage). La procédure expérimentale suivra un protocole de multiples vaccinations décrit dans les monographies de la pharmacopée, par vaccinations répétées de dose vaccinales ou par administration unique de plusieurs doses, tout en respectant, autant que faire se peut, l'application du schéma vaccinal décrit dans le Résumé des Caractéristiques du Produit de l'AMM si celle-ci existe pour une autre espèce ou dans un autre pays.

La procédure sera conduite sur 78 sujets au maximum et pourrait être reconduite si besoin. La probabilité qu'il y ait plus d'une nouvelle émergence par an en moyenne sur une période de 5 ans étant quasi nulle, cette procédure concernera 390 sujets au maximum sur une période de cinq ans. La procédure fera suite aux contrôles *in-vitro* réalisés en laboratoires qui seront utilisés au maximum pour vérifier l'innocuité du vaccin. L'utilisation du modèle animal pour la dernière phase sera cependant indispensable avant la diffusion sur le terrain pour détecter d'éventuels risques inconnus pour l'espèce cible. Le nombre d'oiseaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les oiseaux seront élevés en groupe et bénéficieront d'un enrichissement social, ils auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. En cas d'atteinte de points limites préalablement définis, les oiseaux seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

5497. Régulièrement des maladies nouvelles apparaissent dans les élevages avicoles ou dans l'avifaune sauvage. Ces maladies dites « émergentes » sont dues à l'introduction de pathogènes nouveaux (comme par exemple les métapneumovirus du canard à la fin des années 1990 ou les nouvelles souches de réovirus du poulet en 2014) ou à l'apparition de nouvelles formes d'agents pathogènes existants déjà sur le terrain (nouveaux virus influenza aviaires, virus variants de la bronchite infectieuse ou de la bursite infectieuse du poulet par exemple). Si ces maladies deviennent épidémiques, sont transmissibles à l'Homme ou présentent des caractères économiques, elles deviennent un enjeu de santé publique vétérinaire. Les autorités sanitaires doivent alors proposer des mesures pour les éradiquer ou au moins stopper leur progression. Ces mesures ne peuvent être proposées que si l'agent pathogène est caractérisé sur le plan de sa transmission, de son pouvoir pathogène (aspects cliniques et lésionnels) et de son pouvoir immunogène.

L'objectif de ce projet est soit de caractériser, en cas de besoin urgent, un agent pathogène responsable de maladie émergente en élevage de volailles ou dans la faune sauvage, pouvant représenter un risque pour les élevages de volailles domestiques soit de permettre la mise au point de méthodes de laboratoire destinées au diagnostic par amplification de l'agent pathogène incriminé. Ce projet devrait également permettre la mise au point de méthodes de laboratoire destinées au diagnostic. Pour cela, l'agent pathogène incriminé ou des prélèvements réalisés sur des animaux malades seront inoculés à des volailles exemptes d'organismes pathogènes spécifiés ou à des volailles conventionnelles. Le suivi clinique des animaux et l'analyse de prélèvements réguliers permettront de définir les caractéristiques de l'agent responsable.

Des procédures seront conduites sur 52 ou 78 oiseaux (poulets, dindes ou canards essentiellement) selon l'objectif poursuivi et pourraient être reconduites à chaque nouvelle émergence. Dans le cas improbable où il y aura plus d'une nouvelle émergence par an en moyenne sur une période de 5 ans cette procédure concernera 650 oiseaux au maximum (si on prend en compte tous les cas de figure : « amplification d'un agent pathogène émergent » et « caractérisation du pouvoir pathogène et infectieux d'un agent pathogène émergent »). La procédure précèdera l'identification *in vitro* de l'agent pathogène suspecté d'être responsable de la maladie si celui-ci ne peut être isolé en laboratoire et son identification par des méthodes de laboratoire (moléculaires, virologiques, bactériologiques...), ou fera suite à son isolement *in vitro* si celui-ci est possible. Dans les deux cas, le remplacement du modèle animal n'est donc pas possible car soit l'isolement sera impossible en laboratoire, soit cette dernière phase de caractérisation *in vivo* du pouvoir pathogène et infectieux de l'agent sur l'espèce cible sera indispensable pour la compréhension de la maladie. Le nombre d'oiseaux a été réduit au maximum tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables. Les oiseaux seront élevés en groupe et bénéficieront d'un enrichissement social, ils auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. En cas d'atteinte de points limite préalablement définis, les oiseaux seront euthanasiés afin qu'ils ne souffrent pas.

5498. L'objectif général de cette séance de travaux pratiques de Pharmacologie est d'illustrer par la pratique le cours de Pharmacologie. Toutes les molécules utilisées sont étudiées, soit en pharmacologie générale, soit en pharmacologie fonctionnelle. L'étudiant pourra appréhender la méthodologie employée en recherche pharmacologique : conception et limites d'un test pharmacologique, étapes de la réalisation d'une publication scientifique. A l'issue de cette séance, chaque étudiant doit donc avoir atteint les objectifs ci-dessous énumérés.

- Illustration du cours

Parmi l'ensemble des substances utilisées, certaines doivent être très bien connues. Ce sont celles qui vous sont, par ailleurs, présentées dans le cours. Pour chacune de celles-ci, l'étudiant doit être capable de la rattacher à sa classe pharmacologique, de

citer les grandes lignes de son mécanisme d'action et de citer des exemples d'applications thérapeutiques découlant de ces propriétés.

- Les tests pharmacologiques

Pour le test pharmacologique employé ici, l'étudiant doit être capable d'en évaluer les qualités métrologiques et d'imaginer les changements éventuels à apporter afin de l'améliorer, et de présenter et de commenter les résultats à la façon d'une publication scientifique, sous la forme d'un compte-rendu.

- Utilisation de l'animal de laboratoire

Le test pharmacologique est réalisé sur des lapins anesthésiés. Sa réalisation attentive doit permettre d'acquérir les bases de l'éthique et des bonnes pratiques de l'expérimentation animale, sous le contrôle des enseignants présents, qui disposent tous d'autorisation dans le domaine de l'expérimentation animale, selon la réglementation en vigueur. L'étudiant doit être capable d'argumenter pour et contre l'utilisation de l'animal, au plan de l'éthique et, le cas échéant, de proposer une méthode alternative.

Ce TP s'effectue sur une durée de 1 mois. Deux lapins néozélandais sont utilisés à chaque séance (soit 10/semaine) par un groupe de 7 ou 8 étudiants. Les lapins sont utilisés pour mettre en évidence l'effet biologique de médicaments interagissant avec l'appareil cardio-vasculaire. Plusieurs molécules sont testées et leurs effets sur la pression artérielle, la fréquence cardiaque et la vasomotricité sont déterminés.

On ne peut envisager d'étudier ces effets exclusivement par des approches *in vitro* ou par de l'enseignement assisté par ordinateur. Ce dernier ne permet de répondre qu'à certains objectifs de nos enseignements, il ne peut reproduire la complexité du vivant et ne permet pas d'étudier les réponses hémodynamiques globales provoquées par les substances testées. Le nombre d'animaux est réduit au minimum (40 lapins pour 145 étudiants) afin de permettre à l'étudiant d'effectuer une analyse descriptive correcte. Le bien-être des animaux est surveillé par l'observation de leurs réactions durant l'anesthésie et la période opératoire et par la mise en place d'une couverture analgésique (administration d'analgésique et d'anesthésique local). Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

5499. L'œsophagectomie est l'intervention qui consiste à enlever une partie ou la totalité de l'œsophage. Elle est indiquée en cas de tumeur maligne, parfois de tumeur bénigne, beaucoup plus rarement en cas de détérioration de l'œsophage due à une inflammation ou à une brûlure par absorption de produits caustiques. 1500 œsophagectomies sont pratiquées en France chaque année.

Le chirurgien retire la partie inférieure de l'œsophage, puis relie la partie restante à l'estomac. Ce remplacement est responsable de 5 % de mortalité post-opératoires et de 50 % de complications post-opératoires. Des complications fonctionnelles apparaissent dans 50% des cas.

Il est donc nécessaire de trouver d'autres solutions pour remplacer l'œsophage.

Le but de ce projet est de greffer un œsophage hétérologue (provenant d'un autre organisme) avec ou sans maturation préalable dans l'épiploon, afin de remplacer l'œsophage natif défaillant et de pallier aux défauts des techniques de substitution existantes.

Le projet consiste à implanter après œsophagectomie chez le porc des matrices œsophagiennes porcines décellularisées avec ou sans maturation préalable.

Notre hypothèse est qu'un œsophage hétérologue permettrait d'assurer ce remplacement.

-Il faut au préalable, éliminer toutes les cellules de cet organe pour éviter le rejet après transplantation et ne conserver que les propriétés mécaniques et structurales de l'œsophage.

-La maturation *in vivo* du substitut, dans le corps du cochon, pourrait développer la vascularisation de l'œsophage de remplacement pour mieux le préparer à la greffe. Est-ce que la greffe d'œsophage décellularisé permet de rétablir la continuité de l'œsophage après une ablation et une restauration des fonctions natives de cet organe ?

Est-ce que l'étape de maturation est nécessaire et améliore l'efficacité de la greffe ?

Objectifs et description du projet :

Préalablement au projet, des œsophages porcins sont récupérés en abattoirs, puis décellularisés par méthode chimique. Cette étape ne fait pas partie de la présente saisine et sera réalisée sur un autre site.

Le projet en lui-même consiste à implanter chez des porcs ces matrices décellularisées après œsophagectomie, avec maturation préalable ou non dans l'épiploon. Il y aura 2 groupes de 3 porcs.

Groupe 1 : les matrices décellularisées seront implantées dans l'abdomen de 3 cochons pour qu'elles mûrissent pendant 4 semaines. Ces animaux seront suivis et surveillés pendant tout ce temps. A l'issue des 4 semaines, ces matrices mûries seront récupérées et transposées à la place de l'œsophage après œsophagectomie dans le même temps opératoire.

Groupe 2: 3 cochons subiront une œsophagectomie puis greffe de la matrice décellularisée dans le même temps opératoire.

Justification du projet :

Ces données ne peuvent être obtenues que par des expérimentations chez l'animal. Des études *in vitro* ainsi que l'analyse bibliographique ont été menées au préalable afin de sélectionner les matrices les plus intéressantes à tester *in vivo*. Par ailleurs, ces études n'ont jamais été réalisées.

Cette étude nécessite 2 groupes de 3 cochons chacun, un groupe test (maturation dans l'épiploon) et un groupe témoin (sans maturation). Le porc est l'animal d'expérimentation dont la physiologie digestive est la plus proche de celle de l'homme.

Des porcelets seront utilisés pour que leur taille et leur poids soient compatibles avec la chirurgie envisagée. Des points limites sont déterminés pour minimiser la souffrance et le stress dus aux expérimentations.

Selon la réglementation en vigueur, le principe des 3R est appliqué dans ce protocole d'expérimentation :

- Remplacement : des études *in vitro* et l'analyse bibliographique sont menées en amont afin de cibler précisément les tests à mener pour réduire au maximum le nombre de lots et de tests. Les données manquantes de réparation tissulaire ne peuvent être

menées que sur l'animal entier vivant. La pertinence clinique est obtenue avec des porcs dont la physiologie digestive est la plus proche de celle de l'homme.

- Réduction : 2 lots de 3 cochons = minimum pour obtenir une pertinence statistique des tests choisis.

- Raffinement : les animaux sont hébergés par groupes de 3, afin de faciliter les interactions sociales importantes pour le bien-être des animaux et de réduire l'angoisse. Des chaînes sont fixées contre les parois pour permettre les comportements de jeu. Une période d'acclimatation de 15 jours est effectuée. Durant cette période, les animaux reçoivent une alimentation de type soupe composée d'aliment et d'eau, alimentation qui sera donnée pendant 15 jours post-opératoires. Le suivi des animaux s'effectue quotidiennement, des antalgiques sont donnés lors de signes de douleur. Des points limites sont définis au cours de l'expérimentation afin d'interrompre le protocole en cas de souffrance animale trop importante.

5500. Dans le cadre de l'expérimentation animale, la réglementation prévoit que les personnes accomplissant des actes sur les animaux aient des compétences pour le faire. Ces compétences peuvent être acquises au cours de la formation initiale ou lors de formations pratiques. Elles doivent être validées par l'établissement utilisateur (arrêté du 1er février 2013). Les formations spécifiques en expérimentation animale officiellement reconnues proposent souvent des applications pratiques sur les modèles murins, modèles qui ne sont pas ceux étudiés dans notre laboratoire.

Le but de ce projet est de permettre aux personnes, ayant déjà suivi une formation spécifique en expérimentation animale officiellement reconnue, d'acquérir ou de perfectionner les bons gestes pour la réalisation d'actes sur les volailles, modèles animaux utilisés pour la recherche au sein de notre établissement. Il comporte une procédure pour chacune des espèces poules ou poulets (*Gallus gallus*), dindes et canards, pour la réalisation de prélèvements et d'euthanasie. L'ensemble des procédures prévoit un effectif maximal de 200 animaux pour une période de cinq ans. Les formations seront ciblées sur les personnes devant réaliser ces interventions lors des essais mis en œuvre par leur unité de recherche.

Ce projet est réalisé en dehors des autres projets expérimentaux du laboratoire pour lesquels le nombre d'animaux est calculé au minimum et lors desquels les prélèvements ne peuvent être manqués en raison de l'inexpérience du manipulateur.

Les personnes seront formées en premier lieu à l'aide de démonstration enregistrées en vidéo, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Toutefois, le remplacement complet des animaux n'est pas possible, puisque le but de ce projet est la maîtrise des gestes et que celle-ci ne peut s'acquérir qu'en pratiquant. Le but de ce projet est le raffinement, permettant d'une part aux personnes de réaliser les actes avec les gestes les plus indolores et les moins stressants possibles pour les animaux et d'autre part à réduire les manipulations aux seuls actes utilisés lors des autres projets expérimentaux des unités de recherche.