



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

Résumés non techniques des projets autorisés (55)

5501. Le diagnostic des maladies telles que le cancer ou les endocrinopathies fait appel à la scintigraphie, une technique d'imagerie médicale qui a recours à des produits de contrastes radioactifs. La mise sur le marché des médicaments marqués, à usage thérapeutique et diagnostique pour l'homme, exige des essais d'efficacité : la biodistribution sur rongeurs. Nous réalisons donc régulièrement des tests qui permettent de valider l'innocuité et l'efficacité des marqueurs qui seront utilisés chez l'Homme. Parmi ces tests, une partie fait appel à l'animal. Ils sont imposés à l'industrie pharmaceutique par les autorités européennes qui produisent ces marqueurs.

Le test de biodistribution est réalisé sur rongeurs (rats ou souris). Ces animaux provenant d'un élevage agréé. Le recours à des rongeurs dans le cadre de contrôle qualité de médicaments radiomarqués est préférable à d'autres espèces car ces animaux permettent de fournir des résultats pertinents en utilisant la voie d'administration identique à celle de l'homme lors de diagnostic par scintigraphie.

Il n'est pas possible d'obtenir les renseignements sur la biodistribution des produits sans utiliser un animal vivant anesthésié.

Les tests sont réalisés sous anesthésie générale et ne génèrent aucune souffrance chez les animaux qui sont maintenus endormis durant toute la période du test. Sur une période de 5 ans, nous devrions utiliser 2856 rongeurs (1656 rats et 1200 souris). C'est le nombre minimum qui nous permet d'obtenir des résultats interprétables, en conformité avec la réglementation européenne, pour le test de 710 lots de produits sur 5 ans. Les tests sont réalisés par du personnel spécialement formé à l'anesthésie et à la manipulation des rongeurs, dans des conditions encadrées par les bonnes pratiques de laboratoire.

5502. 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 la production des réactifs (sérum spécifiques) nécessaires.

Ce projet a pour objectif d'être en adéquation avec les exigences réglementaires du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les tests ont pour but de produire des réactifs nécessaires 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.

Aucun dommage n'est attendu, un léger stress lié aux manipulations peut apparaître.

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

Ces tests garantissent la qualité du produit pour les animaux et leur environnement.

Ces tests permettent la mise sur le marché 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 en favorisant les méthodes alternatives.

Pour préparer les réactifs nécessaires à la libération réglementaire des vaccins sur le marché de l'élevage aviaire, jusqu'à 1600 animaux seront nécessaires sur 5 ans : 1500 poulets, 50 canards, 50 dindes.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : la production de sérums hyper immuns n'est possible qu'*in vivo*, à ce jour 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 vaccins.

Raffinement : aucune souffrance ou stress significatif n'est attendu. 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.

5503.

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). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Le projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires, dans la constitution d'un dossier d'AMM et pour la fabrication d'un vaccin commercial. Les tests ont pour but de garantir l'inactivation du principe actif d'un vaccin pour l'espèce cunicole.

Les tests sont effectués sur espèce cible.

Aucun dommage n'est attendu, un léger stress lié aux manipulations et injection des vaccins peut apparaître.

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

Ces tests permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage, nous utiliserons au maximum 100 lapins sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour l'AMM. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de ces pays.

Réduction : le nombre d'animaux est imposé par la réglementation des pays. Une réduction du nombre d'animaux est possible grâce à la mise en commun de lots témoins.

Raffinement : dans ce projet, aucune souffrance ou stress significatif est attendu. 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.

5504. 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). De ce fait, la sécurité des lots de vaccins peut être évaluée sur des modèles animaux.

Le projet a pour objectif d'être en conformité avec les exigences réglementaires de la Pharmacopée Européenne et des pays tiers destinataires, dans la constitution d'un dossier d'AMM et pour la fabrication d'un vaccin commercial. Les tests ont pour but de confirmer l'innocuité, de déterminer l'activité (efficacité) et de vérifier que les vaccins ne contiennent pas d'agents contaminants (test de pureté) pour les vaccins destinés aux volailles.

Aucun dommage n'est attendu, un léger stress lié aux manipulations et injection des vaccins peut apparaître.

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

Ces tests garantissent la qualité du produit pour les animaux et leur environnement.

Ces tests permettent la libération d'un nombre important de doses de vaccins améliorant considérablement la qualité sanitaire des élevages et la sécurité alimentaire des consommateurs.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché de l'élevage : jusqu'à 1100 canards, 1500 dindes et 125 000 poulets seront nécessaires sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3R's :

Remplacement : la Pharmacopée Européenne et les réglementations des pays tiers destinataires du produit demandent des tests sur animaux pour l'AMM. Il n'est actuellement pas possible de les remplacer sans un changement de la réglementation de ces pays.

Réduction : le nombre d'animaux est imposé par la réglementation des pays. Une réduction du nombre d'animaux est possible grâce à la mise en commun des animaux témoins. Le test est aussi réalisable sur les mêmes animaux pour le contrôle de la pureté de vaccins vivant issus du même lot. Les tests d'activité sérologique peuvent aussi être mutualisés. De plus, les tests d'innocuité et de pureté sont réalisés sur les mêmes lots d'animaux. Tout ceci concourt à la réduction du nombre d'animaux.

Raffinement : dans ce projet, aucune souffrance ou stress significatif n'est attendu. 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.

5505. Les chauves-souris sont le réservoir d'agents infectieux qui peuvent causer de graves épidémies chez l'homme (ex. coronavirus, virus de la rage). Dans ce contexte, de nombreuses études se sont intéressées à caractériser la diversité génétique de ces agents infectieux et à identifier les espèces hôtes associées. Cependant, nos connaissances sur les dynamiques d'infection au sein des populations naturelles de chauves-souris sont mal connues. Il a été suggéré que ces dynamiques, et en particulier des pics d'infection à certaines périodes du cycle de vie des chauves-souris, seraient propices à la transmission des agents infectieux vers d'autres espèces animales, dont l'homme. L'objectif de ce projet est de décrire les dynamiques spatio-temporelles d'infection dans les populations de chauves-souris et comprendre les facteurs écologiques qui favorisent la transmission. Pour cela, nous nous focaliserons sur l'espèce de chauve-souris *Mormopterus francoismoutoui*, espèce endémique sur l'île de La Réunion. Des prélèvements biologiques seront réalisés afin d'étudier ces aspects (écouvillon buccal, biopsie de l'aile, collecte d'urine, de fèces, et d'ectoparasites). Les animaux seront marqués individuellement par tatouage sur l'aile grâce à un code alphanumérique afin d'estimer les mouvements entre colonies, et la dynamique d'infection à l'échelle individuelle. Les résultats permettront d'identifier les mécanismes écologiques qui favorisent la transmission spatiale (entre colonies) et temporelle (au sein des colonies) de ces agents infectieux, et donc de mieux évaluer le risque de transmission à d'autres espèces animales. Ce projet est basé sur une approche d'échantillonnage en populations naturelles avec des sessions de capture de chauves-souris réalisées dans plusieurs

colonies de l'île. La manipulation de chaque individu se fera sur le site de capture ; les individus seront hydratés et relâchés sur ce même site après la fin de la manipulation, ou bien après une période de repos de 5 minutes s'ils ne s'envolent pas immédiatement. Les prélèvements biologiques réalisés sont adaptés à la petite taille de cette espèce. Un maximum de 7800 chauves-souris est nécessaire à la réalisation de ce projet, correspondant à un maximum de 60 individus capturés pour chacune des 130 nuits de capture.

5506. Le néocortex est le centre des fonctions cognitives supérieures, telles que la prise de décision ou la perception. Au cours de sa formation, lors du développement embryonnaire, l'ensemble des neurones corticaux proviennent de la division des cellules souches neurales. De nombreuses altérations génétiques sont connues pour entraîner un développement pathologique du néocortex, regroupées sous le nom de malformations corticales. Notre but est de comprendre comment la division des cellules souches neurales est contrôlée afin de permettre la formation normale du néocortex. Nous voulons également déterminer comment des altérations au sein de ces cellules peuvent conduire à un développement pathologique du cerveau.

Afin d'étudier les mécanismes du développement normal et pathologique du cerveau, nous allons interférer avec l'expression de gènes que nous soupçonnons comme importants pour son développement (par exemple du fait de leur lien avec la microcéphalie chez l'Homme). Cette interférence se fera par injection intra-utérine, dans le cerveau embryonnaire, de réactifs spécifiques.

A ce jour, le comportement des cellules souches neurales et la formation du néocortex ne peut être intégralement reproduit en système *in vitro*. Le néocortex étant spécifique des mammifères, nous allons étudier son développement chez la souris (*Mus. musculus*). Cet animal a été choisi car son génome a été séquencé et est très bien caractérisé. De plus, la souris permet l'introduction relativement aisée de modifications génétiques (introduction de mutations qui, chez l'humain, engendrent un développement pathologique par exemple). Pour ce projet, nous allons utiliser 1500 souris et 5000 embryons. Ce nombre est réduit au minimum mais est suffisamment important pour maintenir la significativité statistique.

Les animaux seront anesthésiés et traités, tout au long de la procédure, avec des antidouleurs. La réalisation des injections sur plusieurs embryons de la même portée permettra d'obtenir un maximum d'information pour chaque expérience. En cas de signes clairement définis de douleur ou d'inconfort, les animaux seront systématiquement euthanasiés.

5507. Le contexte actuel de la production porcine vise à élever des animaux efficaces (pour limiter l'utilisation des ressources alimentaires et les rejets liés à l'élevage) et robustes (apte à résister et à s'adapter à différents contextes d'élevage). La consommation moyenne journalière résiduelle (CMJR) du porc est définie par la différence entre la consommation moyenne journalière (CMJ) observée et une CMJ théorique, estimée à partir des besoins d'entretien et de croissance. La sélection sur la réduction de la CMJR permet d'obtenir des animaux plus efficaces. Un programme de sélection divergente sur ce critère a été mené au sein d'une population de porcs Large White. Les animaux de la lignée CMJR+ surconsomment l'aliment par rapport à leurs besoins ; ceux de la lignée CMJR- le sous-consomment. La sélection sur le critère CMJR ne semble pas avoir eu comme effet secondaire de dégrader la susceptibilité des animaux à différents stress ou challenges (thermique, alimentaire, inflammatoire). Les conséquences sur la réponse au sevrage n'ont jamais été caractérisées. Le sevrage est une période très critique pour le porcelet au cours de laquelle il est sensible à des désordres digestifs. C'est de ce fait en élevage porcin, le stade le plus consommateur en antibiotiques. Le projet a pour objectif d'étudier les conséquences de la sélection divergente sur le critère CMJR, sur la capacité des animaux à répondre au sevrage. La capacité d'adaptation des animaux résulte d'interactions multiples entre digestion, flore, immunité qui ne peuvent être étudiées qu'*in vivo* chez l'animal (Remplacer). Nous étudierons la dynamique de la réponse phénotypique de 72 porcs (36 par lignée). Ce nombre d'animaux est réduit au minimum suffisant pour la mise en évidence de différences significatives entre les lots (puissance 90%, alpha 0.05 ; Réduire). Les animaux seront sevrés à 4 semaines et placés dans des cases individuelles pendant 6 semaines pour un suivi individuel. Après cette période expérimentale, ils seront élevés dans des conditions standards dans des cases collectives jusqu'à la fin de la période d'élevage. Le projet implique un suivi - des réponses sur la période de post-sevrage: santé et comportement, croissance, physiologie digestive, microbiote intestinal, statut nutritionnel, statut immunitaire et oxydant et un suivi de la croissance et de la santé sur le reste de la carrière des animaux. Les prélèvements biologiques (fèces et sang) et pesées seront effectués au même moment. Les prises de sang seront limitées à 3 sur l'ensemble de la vie de l'animal. Ces mesures visent à limiter la manipulation, le dérangement des animaux et la douleur. Le protocole expérimental (logement, soins, alimentation,...) garantira un maximum de confort aux animaux (Raffiner). Cette approche multidisciplinaire permettra de mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans l'adaptation aux conditions de sevrage et de voir si ces mécanismes diffèrent suivant les lignées CMJR. L'utilisation de ce critère d'efficacité pour sélectionner les animaux n'est pertinent que s'il ne s'accompagne pas d'une dégradation du statut physiopathologique de l'animal au sevrage.

5508. L'obésité est associée à des troubles neurocomportementaux, physiologiques et métaboliques bien décrits chez l'Homme et le modèle mini-porc. Cependant, nous ne savons pas encore si ces anomalies sont principalement dues à la prise de poids ou si la consommation d'aliments riches en gras et en sucre, indépendamment du poids corporel, peut suffire à induire ces anomalies, voire à favoriser ultérieurement l'installation d'une obésité. De même, nous ne savons pas dans quelle mesure une perte de poids significative chez l'obèse peut modifier le fonctionnement cérébral et les préférences alimentaires. L'objectif de ce projet de recherche est de réaliser pour la première fois une étude longitudinale sur un modèle animal pertinent (N=30 mini-porcs Yucatan, mâles et femelles + 10 animaux pour des mises au point de chirurgie soit 40 animaux au total) qui permettra d'explorer sur les mêmes sujets les mécanismes neurocognitifs et métaboliques altérés par 1) la consommation chronique d'aliment gras et sucré

(N=20) vs. la consommation d'un aliment équilibré (N=10) sans prise de poids, 2) la mise en place d'un état d'obésité via la consommation ad libitum d'un aliment gras et sucré, et 3) une perte de poids induite soit par une chirurgie bariatrique, soit par une restriction calorique. Les étapes 2 et 3 ne seront réalisées que sur les 20 animaux ayant reçu initialement un aliment gras et sucré. Les diverses mesures réalisées lors de ces trois étapes du protocole permettront de décrire les influences respectives de l'alimentation et du poids corporel sur le comportement, la physiologie digestive et le cerveau. Des tests comportementaux permettront d'étudier les préférences et la motivation alimentaire, ainsi que les capacités cognitives des sujets. L'activité cérébrale sera estimée grâce à la tomographie par émission de positons (¹⁸F-fluorodesoxyglucose) et l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf), méthodes non invasives requérant l'anesthésie des sujets. Lors de l'étape 3) du protocole, une chirurgie bariatrique de type by-pass (N=8) ou une chirurgie fantôme (N=8) sera réalisée. Lors de l'imagerie, des prélèvements de sang seront effectués pour doser certaines hormones gastro-intestinales pouvant servir de marqueurs de l'obésité. Fèces et urines seront prélevés pour réaliser une étude métabolomique et voir dans quelle mesure les différentes interventions prévues influencent le microbiote. Les données physiologiques et comportementales seront analysées par le test statistique ANOVA à multiples facteurs pour étudier les effets du traitement, du sexe, des étapes du protocole et de leurs interactions. Les données issues des imageries cérébrales seront analysées par cartographie statistique paramétrique (SPM) qui représente la méthode de référence pour ce type d'analyse.

Ce protocole de recherche a été conçu dans le respect de la règle des 3R :

Remplacer – Le modèle mini-porc est le seul modèle animal chez lequel des anomalies cérébrales similaires à celles décrites chez l'Homme obèse ont été mises en évidence. Aucune approche *ex vivo* ne permettrait de répondre aux objectifs annoncés et les modèles rongeurs sont beaucoup moins appropriés que le modèle porcin pour ce genre d'étude translationnelle.

Réduire – Les effectifs d'animaux utilisés pour cette étude sont suffisants pour bénéficier d'une puissance statistique appropriée aux mesures réalisées. La plupart des articles déjà publiés chez ce modèle font état de 7 à 8 animaux par groupe. Nous en aurons 10 (soit 8 animaux soumis aux tests et imagerie + 2 surnuméraires par groupe).

Raffiner – Les approches d'imagerie et de chirurgie ont été choisies et raffinées de manière à être les moins invasives possible (i.e. imagerie *in vivo* sur animaux anesthésiés, chirurgie par cœlioscopie). Après une pré-anesthésie à la kétamine (5 mg/kg), l'anesthésie sera induite sous masque à l'isoflurane (3-5% v/v) puis poursuivie sous intubation. Un niveau chirurgical d'anesthésie sera maintenu tout au long de l'acte réalisé sous monitoring. L'analgésie sera complétée au réveil par une dose de chlorhydrate de morphine sous cutanée (10 mg *in toto*) et un traitement antibiotique prophylactique sera appliqué. Une procédure d'anesthésie similaire sera utilisée durant les séances d'imagerie cérébrale, mais sans analgésie puisque l'imagerie est totalement indolore.

5509. Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause mondiale de morbidité et mortalité résultant de complications coronariennes (angor et infarctus du myocarde) et carotidiennes (accidents vasculaires cérébraux (AVC) et ischémiques transitoires (AIT)). Ces patients présentent des signes cliniques faisant suite à la rupture d'une plaque d'athérosclérose vulnérable ou à un phénomène d'embolisation menant à l'occlusion d'artères. La rupture de ces plaques d'athérosclérose vulnérables provoque la formation d'un thrombus (caillot de sang) qui obstrue potentiellement la lumière du vaisseau, entraînant l'ischémie (diminution ou absence d'apport sanguin à un organe) myocardique et l'infarctus du myocarde ou bien l'embolisation à distance d'artères cérébrales menant à l'AIT ou l'AVC (qui représente la première cause de handicap chez l'adulte).

A l'heure actuelle, il n'existe aucune technique d'imagerie qui permet la détection des plaques d'athérosclérose vulnérables. L'enjeu clinique de notre projet repose sur la détection précoce des plaques vulnérables permettant la prévention de ces accidents ischémiques dans une population à risque cardiovasculaire.

Les plaques d'athérosclérose sont le résultat d'un remaniement des artères par accumulation de lipoprotéines, sang et produits sanguins, dépôts calcaires et autres minéraux. Des précédentes études ont montré que les lipoprotéines HDL (High Density Lipoproteins en anglais) étaient recrutées au niveau de la plaque pour leur activité de transport de cholestérol, principal constituant de la plaque d'athérosclérose. On y retrouve une surexpression de plusieurs récepteurs membranaires spécifiques des HDL ou de leur lipoprotéine principale l'ApoA1 : SRB1 et ABCA1.

L'objectif de notre projet est d'évaluer les HDL radiomarquées au ⁶⁸Ga, comme nouveau radiotraceur des plaques d'athéromes en imagerie TEP (Tomographie par Emissions de Positons).

Pour réaliser notre projet nous utiliserons un modèle d'athérosclérose murin avec des souris transgéniques dépourvues du gène de l'Apolipoprotéine E, appelées KO ApoE. Celles-ci développent des plaques d'athérome naturellement en vieillissant (6 mois d'âge). Ce modèle est connu de notre équipe de recherche. Nous utiliserons des souris non transgéniques et avec le même fond génétique pour nos contrôles : les C57BL/6.

Un total de 13 souris sera utilisé.

Notre protocole respecte les 3R. L'athérosclérose étant un phénomène physiopathologique complexe, les modèles cellulaires ne sont pas appropriés et il est nécessaire de recourir à des organismes vivants. Il n'existe pas de modèle cellulaire d'athérosclérose.

Le modèle animal utilisé n'induit pas de souffrance puisque les plaques d'athéromes sont indolores. Les animaux seront observés quotidiennement pendant l'étude et l'atteinte d'un point limite conduira à l'exclusion de l'animal de l'étude. La procédure d'imagerie n'induit pas de douleur, les souris sont anesthésiées tout au long des acquisitions et les produits injectés seront testés *in vitro* pour s'assurer de leur innocuité.

5510. L'utilisation de nanomatériaux manufacturés (MNMs) dans les aliments (additifs) et les emballages doit s'accroître considérablement dans l'avenir. Pourtant, leur toxicité après ingestion reste mal connue et constitue aujourd'hui une préoccupation

majeure en Europe et dans le monde. En effet, face à la multitude de MNMs potentiels, les données de toxicité sont encore insuffisantes et les résultats des études menées sont souvent contradictoires.

En particulier, peu de données ont été à ce jour générées sur les effets chez le fœtus et le passage de la barrière placentaire. Ce projet s'intéressera aux effets des nanoparticules d'or chez la lapine gestante. Des études précédentes ont montré leur passage de la mère au fœtus. La toxicité sur l'ensemble mère/fœtus requiert cependant des données complémentaires, en particulier sur la capacité de ces nanoparticules à provoquer des dommages de l'ADN. Comme il n'existe pas de modèle *in vitro* pour étudier ces effets sur le fœtus, seules des études sur animal peuvent être réalisées. Les animaux seront traités par voie orale aux MNMs et, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux, plusieurs tests de toxicité seront réalisés simultanément sur plusieurs organes à partir d'un même animal. Cette étude comprend une pré-étude qui utilisera 10 animaux pour valider les tests de génotoxicité sur lapines gestantes et une étude principale qui utilisera 30 animaux pour étudier la génotoxicité des nanoparticules d'or chez la lapine gestante, soit 40 lapines gestantes au total. Sur chaque femelle, deux fœtus seront prélevés soit au total 80 fœtus. Aucune souffrance et aucune douleur dues au traitement ne sont attendues. Aucun prélèvement sur animal vivant n'est prévu.

5511. Il est connu depuis plusieurs décennies que les carences en vitamines B9 (folates) et B12 pendant la grossesse peuvent être à l'origine de malformations chez le nouveau-né, notamment le défaut de fermeture du tube neural. Depuis les années 1990, l'Organisation Mondiale de la Santé préconise une supplémentation en folates chez les femmes en période péri-conceptionnelle et durant le premier trimestre de la grossesse, ce qui a permis une réduction de ce type d'anomalie de l'ordre d'environ 30%.

Des modèles animaux ont permis de mettre en évidence que l'exposition précoce à une telle carence en vitamines B9 et B12 peut entraîner une altération du développement du cerveau ainsi qu'une susceptibilité plus grande à des désordres psychiatriques, tels que l'anxiété, la dépression, mais aussi l'autisme et la schizophrénie. Nos travaux antérieurs ont permis de montrer qu'une carence précoce en donneurs de méthyles entraînait des désordres métaboliques et épigénétiques altérant le développement cérébral en période post-natale.

Au cours de ces dernières années, il est apparu que le comportement alimentaire du père avait une grande importance sur le développement du fœtus et la santé de l'enfant à naître. D'une manière générale, les hommes sont plus exposés que les femmes aux facteurs environnementaux qui pourraient entraîner un risque de déficience en folates, comme le tabagisme, la consommation d'alcool et une alimentation plus pauvre en fruits et légumes qui constituent le principal apport en folates. Les données épidémiologiques suggèrent des modifications phénotypiques de nature transgénérationnelle reliées à des altérations épigénétiques dans le sperme des pères carencés. Des études menées sur des souris mâles ont montré qu'une déficience en folates d'origine paternelle entraîne une altération des processus de régulation du génome dans le sperme, associée à un risque de mort prématurée et des malformations cranio-faciales et musculo-squelettiques chez la descendance. En dehors des données sur les processus de régulation du génome du sperme, les effets potentiels de la carence d'origine paternelle restent très peu documentés, notamment au niveau du cerveau.

Notre projet consiste en la mise en place d'un modèle animal de carence paternelle en folates afin d'en étudier les conséquences sur le développement cérébral chez la descendance.

1. Remplacement : Il n'existe aucune alternative d'approche *in vitro* car notre étude porte sur les effets transgénérationnels d'une carence nutritionnelle paternelle sur le développement et le vieillissement des individus.

2. Réduction : notre étude portera sur 460 rats de laboratoire (20 mâles reproducteurs et 40 femelles reproductrices, pour une progéniture estimée à 400 ratons dont 160 seront utilisés dans le projet) répartis en 4 groupes d'études. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, à savoir 10 animaux par groupe, permettant ainsi l'interprétation scientifique des résultats par des tests statistiques appropriés. Les animaux maintenus en vie à l'issue du projet serviront à compléter des effectifs pour d'autres protocoles à venir, ou mis à disposition d'autres animaleries en cas de besoin (notamment pour les enseignements), ou encore mis à mort si aucune option n'était retenue.

3. Raffinement : Nous commençons chaque protocole expérimental par une période d'acclimatation de 2 semaines à ce nouvel environnement. Les animaux sont hébergés à 2 par cage pour empêcher l'isolement social et sont surveillés quotidiennement. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé à 20% de perte du poids corporel avec un repérage des signes éventuels de mal-être. Selon notre expérience, aucune souffrance ne devrait être induite chez les animaux car les procédures sont basées sur des modifications alimentaires de quelques semaines (carence vitaminique chez 10 mâles durant 4 semaines et supplémentation vitaminique chez 20 femelles durant 6 semaines). Le test de comportement sera un chronométrage des ratons pour retrouver l'odeur maternelle. En fin de protocole les animaux (mâles reproducteurs et portées) seront anesthésiés avant leur euthanasie et des prélèvements seront effectués (sang, cerveau, organes génitaux) pour permettre de faire des analyses biochimiques et d'observer les changements métaboliques dans chaque organe.

5512. L'obésité est un problème de santé publique mondiale. Il a été montré que le nombre d'accident vasculaire cérébral (AVC) est plus élevé chez les personnes obèses que dans le reste de la population, indiquant l'installation d'une fragilité des vaisseaux sanguins cérébraux dans cette pathologie. Cette fragilité induit rapidement une dérégulation du débit sanguin cérébral (DSC) en réponse à une augmentation de l'activité neuronale, ce qui peut entraîner la mort des neurones, avant même l'avènement de l'AVC. Le suivi fonctionnel du DSC *in vivo*, dans le temps, avec l'accumulation d'une prise d'aliments hypercaloriques, est donc très intéressant pour dépister un problème sous-jacent des vaisseaux sanguins.

Pour connaître l'état fonctionnel des vaisseaux sanguins pendant l'installation de l'obésité, puis avec une augmentation de la durée d'alimentation hypercalorique à long terme en étudiant le vieillissement, nous voulons mettre au point une méthode d'imagerie cérébrale dans un modèle d'obésité chez la souris, modèle obtenu par une alimentation enrichie en lipides. Connaissant la forte

sensibilité olfactive des rongeurs, nous enregistrerons les variations de DSC en réponse à la présentation d'odeurs chez la souris anesthésiée. L'étude *in vivo* des souris obèses est nécessaire et ne peut être remplacée par des études chez des invertébrés qui ne présentent pas d'obésité ou de vaisseaux sanguins qui ressemblent à ceux des mammifères.

Le principe de la technique d'imagerie à large champ repose sur le fait que les propriétés optiques du tissu qui sont enregistrées par une caméra sont perturbées par le mouvement d'objets microscopiques en mouvement (ici les globules rouges dans le sang) créant ainsi un contraste sur l'image qui est exploitable pour détecter des changements de DSC.

Pour effectuer la comparaison entre des groupes de souris obèses et de souris témoins non obèses, à différents temps au cours du vieillissement (3, 9 et 12 mois de régime hyper lipidique), le nombre de souris utilisées sera de 219 sur 3 ans. Ce nombre comprend les tests que nous effectuerons pour observer l'effet éventuel d'une protection des vaisseaux sanguins par enrichissement des cages des souris, un enrichissement apportant un bien-être des animaux en continu. Le remplacement des souris n'est pas possible dans le cadre de ce projet puisqu'aucun modèle invertébré ou modèle cellulaire *in vitro* ne permet de reproduire l'activité vasculaire ou l'obésité des mammifères. Le nombre de souris utilisé sera minimisé suivant le degré de liberté des tests statistiques et de leur significativité. Au niveau du raffinement, les douleurs provenant des microchirurgies cérébrales seront réduites à leur minimum par l'utilisation d'agents anesthésiques et analgésiques appropriés dans le protocole d'imagerie. Dans ce même protocole terminal, toutes les souris seront mises à mort en fin d'enregistrement par une injection d'agent anesthésique. Nous développerons des modèles de tissu cérébral *in vitro* pour estimer les caractéristiques du dispositif d'enregistrement et calibrer notre système d'imagerie, avant tout enregistrement chez l'animal *in vivo*. Enfin, nous avons prévu l'apparition possible de problèmes de santé chez les souris pendant le régime hyper lipidique en définissant des critères d'observation et des points limites dans les protocoles concernés puisque nous comptons également observer les animaux pendant leur vieillissement.

5513. La régulation du taux de glucose sanguin (glycémie) est assurée par 2 hormones: l'insuline, hormone hypoglycémiant responsable de la baisse du taux de glucose sanguin et le glucagon, hormone hyperglycémiant responsable de l'élévation du taux de glucose sanguin.

Ces hormones sont produites dans le pancréas, plus particulièrement dans les îlots de Langerhans. Les cellules β produisent et libèrent l'insuline. Le glucagon quant à lui est produit et libéré par les cellules α .

La sécrétion de ces hormones à l'effet opposé est interdépendante: lorsque l'insuline est sécrétée, elle empêche la sécrétion du glucagon.

Le diabète de type 2 est caractérisé par une hyperglycémie chronique due à la résistance à l'insuline des organes périphériques couplée à la perte de fonction des cellules β . Plus récemment, il a été démontré que les cellules α sont également impliquées dans cette pathologie: chez les patients diabétiques une sécrétion augmentée du glucagon a été mise en évidence favorisant l'hyperglycémie chronique.

Notre laboratoire a récemment mis en évidence le rôle des lysosomes, des organites responsables de la dégradation de composés intracellulaires, dans la régulation de l'insuline. Au cours de cette étude, nous avons découvert, dans le pancréas de souris, l'expression massive de la protéine LIMP2 spécifiquement dans les cellules α . L'étude *in vitro* des cellules α a permis la détection de cette protéine sur les granules contenant le glucagon.

Du fait du rôle central du glucagon dans la régulation de la glycémie, nous souhaitons évaluer l'impact au niveau métabolique de l'absence de cette protéine dans les cellules α .

Pour ce faire, notre laboratoire a importé des souris génétiquement modifiées dans lesquelles la protéine Limp2 a été invalidée (Limp2 KO). Ces animaux, ainsi que des souris contrôles, seront soumis à des séries de tests métaboliques vérifiant la capacité de sécrétion de glucagon par les cellules α et d'insuline par les cellules β . Ces tests seront réalisés sur des souris suivant un régime alimentaire standard ainsi que sur des souris soumises à un régime enrichi en graisse.

Le régime riche en gras va entraîner un contexte pré-diabétique en provoquant une obésité et une résistance à l'insuline.

Le rôle de la protéine Limp2 dans le métabolisme, n'a jamais été étudié.

La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes tels la souris. Les observations que nous allons faire sur les animaux permettront donc de compléter, de corroborer et de valider dans un contexte physiologique des mécanismes observés *in vitro* sur des cellules en culture. Par conséquent, dans notre cas nous ne pouvons pas remplacer la souris comme modèle.

Nous utiliserons un total de 100 souris réparties en 4 groupes de 25 souris. Ce nombre est nécessaire pour mettre en évidence de manière fiable, en éliminant les variations individuelles, les phénotypes métaboliques. Des variations individuelles pourraient en effet apparaître en raison du fond génétique mixte de cette lignée. Par ailleurs, ce projet constituant une première étude métabolique sur cette lignée de souris (les souris Limp2 KO n'ont jamais été caractérisées d'un point de vue métabolique) nous testerons des groupes relativement importants pour être sûrs que les variations individuelles ne masquent pas un éventuel phénotype. Par souci de réduction du nombre d'animaux, nous procéderons aux différents tests sur les mêmes animaux.

Des analyses statistiques (test de Student et ANOVA) seront réalisées pour comparer les réponses des différents groupes aux tests métaboliques.

Nous raffinerons nos expériences afin d'éviter le stress des animaux lors des différents tests: ils seront réalisés par du personnel qualifié, les animaux seront habitués à la manipulation par l'expérimentateur plusieurs jours avant de les tester, un antalgique local sera appliqué pour éviter l'inconfort lié aux prélèvements sanguins, les volumes prélevés seront faibles et les volumes de glucose injectés seront proportionnels au poids de chaque animal.

Il est à noter que les animaux Limp2 KO développent à partir de 3 mois une surdité et des problèmes rénaux s'aggravant avec l'âge. A partir de l'âge de 6 mois, ces souris peuvent également présenter une neuropathie périphérique. Pour ces raisons, les animaux seront mis à mort à l'âge de 20 semaines maximum et feront l'objet d'un suivi régulier pour vérifier leur état de santé. Les animaux seront mis à mort s'ils présentent une perte de poids supérieure à 20% ou des signes de souffrance importants.

5514. Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune rare caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigés contre l'organisme) pathogènes et associée à une inflammation de plusieurs organes. Le développement de cette maladie semble parfois lié à des facteurs génétiques. Ainsi, une mutation du gène STING, conduisant à une hyperactivation de ce gène, a été décrite dans une famille comportant plusieurs membres atteints d'un syndrome inflammatoire systémique (appelé SAVI) associée à des symptômes proches d'un lupus. L'hyperactivation de la protéine STING, chez ces patients, conduit à la production excessive d'interféron de type I (IFN-I), molécule importante dans le développement du LED. Afin de mieux comprendre les conséquences de cette mutation sur le développement d'une auto-immunité, nos collaborateurs ont généré un nouveau modèle transgénique murin (modèle STING V154M), portant la mutation de STING équivalente à celle décrite chez les patients. Ce modèle murin unique offre l'opportunité d'effectuer des investigations impossibles chez l'Homme, notamment de comprendre les mécanismes du développement de l'inflammation et de l'auto-immunité en cas d'hyperactivation de STING. Ce projet va permettre de disséquer le rôle intrinsèque du gain fonction de STING dans les cellules du sang et au cours de la réponse immunitaire mettant en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes lymphoïdes. Pour cela nous allons effectuer des transferts de moelle osseuse en utilisant les souris transgéniques Sting V154M.

Afin de respecter la règle des 3R, une réduction du nombre d'animaux utilisés a été décidée. Pour répondre à cet objectif, et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (Student t-test), nous prévoyons d'analyser des groupes de 10 souris par transplantation, soit 135 souris pour le projet global.

Pour répondre à l'objectif de raffinement, les souris seront observées régulièrement et les dispositions adéquates (euthanasie) seront prises si la souffrance des animaux devait atteindre les points limites.

La règle du remplacement n'est pas applicable ici : en effet, nous devons avoir recours à un modèle *in vivo* afin d'étudier les réponses immunes, le développement des lymphocytes et la production d'autoanticorps qui mettent en jeu des coopérations cellulaires multiples dans les organes lymphoïdes tels que la rate et les ganglions. Pour ces raisons, nous ne pouvons pas avoir recours à des modèles *in vitro*.

5515. Les parathyroïdes sont de petites glandes rattachées à la glande thyroïde, généralement au nombre de quatre, situées dans le cou et qui sécrètent la parathormone favorisant la régulation des taux de calcium dans le sang. La connaissance de l'anatomie des glandes parathyroïdes et leur identification est fondamentale dans la chirurgie de la thyroïde et des parathyroïdes. Le but de l'intervention chirurgicale est de réséquer le tissu thyroïdien ou parathyroïdien pathologique et de laisser en place les glandes parathyroïdes normales. Cette intervention est considérée comme difficile essentiellement en raison de la petite taille de ces glandes et du fait qu'elles ne sont pas toujours localisées exactement au même endroit dans le cou, pouvant rendre leur recherche parfois laborieuse. Une identification erronée peut entraîner des dommages au niveau des glandes parathyroïdes normales ce qui conduit le plus souvent à une hypocalcémie transitoire ou permanente. Deux études cliniques récentes ont montré que les glandes parathyroïdes avaient la propriété d'auto-fluorescer dans le proche infrarouge, après excitation par une source de lumière de longueur d'onde adaptée, et que le signal observé présentait un intérêt majeur pour leur détection et leur préservation au cours des chirurgies de la thyroïde ou des parathyroïdes. Ces études ont également permis de mettre en évidence les évolutions techniques qui seraient nécessaires d'apporter pour améliorer la détection des glandes parathyroïdes par auto-fluorescence au cours des chirurgies.

Dans ce contexte, un nouveau système d'imagerie de fluorescence a été développé avec pour objectif d'améliorer la visualisation et la détection des glandes parathyroïdes par autofluorescence mais également de pouvoir évaluer leur vascularisation, et donc leur viabilité, suite à l'injection intraveineuse de vert d'indocyanine (ICG).

L'objectif de cette étude est d'évaluer, chez le lapin, la sensibilité du nouveau dispositif pour la détection des glandes parathyroïdes en autofluorescence, mais également pour l'évaluation de leur vascularisation, après injection de vert d'indocyanine. Cette étude ne peut se faire que sur animaux vivants (application du principe du remplacement).

Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la réduction et le raffinement : le nombre minimum d'animaux permettant le recueil de données exploitables pour une étude de faisabilité sera utilisé. Les animaux seront hébergés avec enrichissement du milieu de vie ; un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé.

5516. Le récepteur de la ryanodine est une protéine essentielle pour la contraction musculaire, et son absence totale conduit chez la souris à la létalité dans les premières heures post-natales. Chez l'homme, l'absence totale de protéine n'a jamais été décrite, mais une réduction de la quantité de protéine en dessous de 50% conduit à une myopathie dont la sévérité semble proportionnelle à la quantité de protéine. Les patients les plus sévèrement atteints que nous étudions présentent entre 10 et 30% de protéine. Nous avons développé un nouveau modèle de souris chez lequel l'extinction du gène RYR1 sera induite uniquement dans les muscles et uniquement après injection du produit inducteur. Nous espérons pouvoir aboutir à une réduction proportionnelle à l'injection. Ce modèle doit permettre de comprendre le rôle de RYR1 dans la formation et le maintien de l'intégrité musculaire, de comprendre le développement de la pathologie chez l'homme et de trouver des nouvelles approches thérapeutiques, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Ce modèle inductible permettra de réduire le

nombre d'animaux utilisés pour la compréhension du rôle de RYR1 dans les pathologies humaines en remplaçant totalement le modèle actuellement utilisé non inductible et létal. Après maîtrise du modèle et de l'induction, au lieu de produire de multiples animaux par croisement de souris hétérozygotes et de ne garder que les nouveaux nés homozygotes (modèle KO total), il sera possible de se limiter à la production du nombre d'animaux directement nécessaires (la lignée étant normale à l'état homozygote, des animaux homozygotes seront donc gardés pour le maintien de la lignée). Par ailleurs, l'extinction du gène ne sera induite qu'au moment nécessaire, réduisant la durée de la pathologie chez l'animal, et à un niveau qui ne conduira pas à la létalité de l'animal et ne provoquera pas de souffrance. Pour la mise au point du protocole et le développement du modèle, une quantité de 320 souris est prévue. Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

5517. Ce projet a pour but de vérifier le mécanisme d'action d'un gène d'intérêt, sur modèle murin. Ce gène est exprimé très spécifiquement dans l'hypothalamus et la glande hypophysaire, organes ayant une fonction déterminante pour la production de différentes hormones, dont l'hormone de croissance. Par l'analyse de deux modèles murins que nous avons générés, nous avons révélé un lien entre l'expression de ce gène et la croissance des animaux, cela dès les premières semaines de vie. En effet, en l'absence de ce gène les souris naissent plus petites, tandis qu'une augmentation de l'expression du gène entraîne la naissance de souris plus grandes. En dehors de ces effets, les souris sont parfaitement saines et fertiles.

Compte-tenu de ces résultats, nous souhaitons réaliser différentes analyses pour comprendre le mécanisme d'action de ce gène clef. Le DEXA-Scan est un appareil qui va nous permettre d'analyser les caractéristiques corporelles de notre modèle murin en termes de densité osseuse, musculaire et adipeuse. Cette analyse sera cruciale pour comprendre le rôle physiologique du gène étudié sur la croissance.

Le projet consiste à réaliser cette analyse, pour chacune des deux lignées, sur 8 animaux sauvages (non génétiquement modifiés) et 8 animaux mutants d'environ 7 semaines d'âge, après une période d'habituation de 2 semaines. Un total de 32 souris maximum est donc prévu.

Notre projet a été élaboré en conformité avec le principe des 3R :

- Remplacement, par l'utilisation de systèmes cellulaires pour les approches biochimiques lors des études réalisées en amont de ce projet. L'étude de l'effet du gène sur la croissance d'un animal et sur sa composition corporelle ne peut actuellement pas être remplacé par une technique *in vitro* ;

- Réduction, en pratiquant autant que possible des analyses d'ordres phénotypique, cellulaire et moléculaire sur le même animal ; de plus, le nombre d'animaux a été déterminé pour être l'effectif minimum et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement relevant.

- Raffinement, par une manipulation minimale des animaux vivants et l'application de procédures d'euthanasie en cas de signes de souffrance et de détresse de l'animal. Enfin, toute procédure stressante sera réalisée sous anesthésie générale, afin de réduire le stress à son minimum.

5518. Le développement de nouveaux produits pharmaceutiques bénéficie de progrès continus dans la recherche biomédicale à la fois pour les adultes et pour les enfants. Certaines maladies sont spécifiques à l'enfant et d'autres durent toute la vie, mais doivent être traitées dès le début de l'enfance. L'évaluation de la sécurité des nouveaux médicaments pédiatriques est assurée par la conduite d'études toxicologiques sur des animaux juvéniles. Aujourd'hui, le mini-porc est considéré comme une espèce non-rongeur alternative fondamentale pour les tests de sécurité des produits pharmaceutiques. Les parallèles entre l'homme et le mini-porc sont nombreux : anatomie, physiologie et biochimie. Ces parallèles sont d'autant plus vrais concernant le système cardiovasculaire, le tube digestif, le système urogénital, le métabolisme des médicaments et la peau. Pour les études de toxicologie juvénile, le développement des organes ou systèmes principaux du mini-porc (y compris le système immunitaire) nécessite encore une caractérisation plus poussée. Bien que le système immunitaire du porc adulte ait été étudié, notamment dans le cadre des maladies infectieuses et les xéno-transplantations, le développement du système immunitaire chez les porcs juvéniles est encore peu connu. Le but de ce projet est de cribler et d'identifier les populations de cellules immunitaires de la peau de mini-porc durant le développement post-natal, de la naissance jusqu'à l'âge adulte (6 mois), qui ne peut se faire qu'*in vivo* (remplacement). Ainsi, nous allons déterminer la présence, dans le derme et l'épiderme (peau), de différentes populations de cellules immunitaires. L'étude de la peau des mini-porcs va être réalisée dans des conditions physiologiques ou inflammatoires sur deux portées et utilisera 12 mini-porcs. Afin de réduire le nombre d'animaux au cours de l'étude, le même animal sera suivi au cours de son développement. Des biopsies de peau des mini-porcs et des prises de sang vont être réalisées puis analysées par différentes techniques d'analyses biologiques. Les biopsies se feront sous anesthésie et le schéma de prélèvements sanguins suivra les recommandations nationales, internationales et internes en termes de volumes et fréquences de prélèvement. Une récompense sera donnée à chaque animal après chaque jour de prélèvement. Tout au long du projet, les animaux seront socialisés et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire.

5519. Le syndrome de l'X Fragile (FXS) est la forme la plus commune de retard mental et d'autisme héréditaire. Ce syndrome est dû à la perte d'expression du gène FMR1 et de son produit, la protéine FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein). Si le FXS est extensivement étudié depuis 25 ans, aucune thérapie n'existe à l'heure actuelle. Nos travaux *in vitro* montrent qu'il est possible

d'améliorer des défauts moléculaires et cellulaires qui sont à l'origine de certains symptômes observés chez les patients FXS. Pour cela, nous avons ciblé avec des molécules chimiques une enzyme de la famille des phosphodiesterases (PDE), impliquée dans la dégradation de certains seconds messagers intracellulaires. Dans le cadre de la règle des 3R, nous avons remplacé les animaux par des cultures cellulaires en réalisant une étude *in vitro* de l'interaction entre FMRP et l'ARNm de PDE, et obtenu des résultats très prometteurs en inhibant cette enzyme dans des cultures cellulaires. Nous avons notamment montré que la protéine FMRP régule l'expression de PDE. Cependant, pour des raisons d'éthique évidentes, avant de tester ces molécules chez l'homme, nous souhaitons en valider l'effet sur un modèle de souris génétiquement modifié qui reproduit fidèlement les symptômes comportementaux et neuro-anatomiques des individus atteints de FXS. Ces animaux ne présentent néanmoins aucun problème de santé générale ni de douleur chronique. Nous pratiquerons des tests non invasifs, basés sur l'observation de certains comportements sociaux, cognitifs et sensori-moteurs après administration des molécules d'intérêt. Nous observerons également l'effet de ces molécules sur le niveau d'anxiété des animaux, qui sera mesuré avec des tests spécifiques. Dans le cadre de la règle des 3R, nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés en estimant au plus juste le nombre d'animaux total nécessaire à cette étude par des tests statistiques afin de limiter le nombre d'animaux employé tout en garantissant l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Nous utiliserons un maximum de 656 animaux, que nous réduirons si nous le pouvons à un minimum de 560 animaux (cela dépendra de la différence due au genre des animaux). Enfin, nous mettrons en place le raffinement en minimisant les souffrances éventuelles liées à l'expérimentation par la mise en place de points limites précoces et adaptés, ainsi que par l'ajout d'éléments d'enrichissement dans nos conditions d'élevage. Ce projet nous permettra de valider une nouvelle piste thérapeutique pour des patients pour lesquels aucune pharmacopée spécifique et efficace n'est à ce jour disponible.

5520. L'insuline est une hormone cruciale dans le maintien du taux de glucose sanguin (glycémie) à un niveau normal. Cette hormone est sécrétée dans le pancréas par les cellules β des îlots de Langerhans. Après l'ingestion d'aliments, la glycémie augmente. Les cellules β détectent cette augmentation et vont sécréter dans le sang l'insuline qui permettra aux organes périphériques d'utiliser le glucose sanguin.

Le diabète de type 2 est une maladie en expansion constante, fortement liée à l'obésité, entraînant de nombreuses complications médicales (cécité, infections, accidents cardio-vasculaires) dues à une hyperglycémie chronique.

Cette maladie est caractérisée par une résistance à l'insuline (les organes périphériques sont moins sensibles à l'insuline) couplée à une baisse voire un arrêt de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans.

L'étude des cellules β , dont le rôle est de sécréter l'insuline, est donc importante pour étudier les mécanismes d'apparition de cette maladie.

Récemment, il a été montré que lorsqu'elles sont soumises à un jeûne, ces cellules réagissent de manière particulière en dégradant leurs granules d'insuline. Nos études en cours montrent que ce mécanisme est dérégulé chez des souris diabétiques, conduisant à une dégradation incontrôlée des granules d'insuline. Ces granules sont dégradés dans un compartiment cellulaire appelé lysosome. La protéine CD63, un constituant majeur des lysosomes, pourrait être impliquée dans ce mécanisme.

Afin de vérifier cette hypothèse, notre laboratoire a importé une lignée de souris déficientes en CD63. Ces animaux, ainsi que des animaux contrôles, seront soumis à des séries de tests métaboliques vérifiant la capacité de sécrétion d'insuline par les cellules β . Ces tests seront réalisés sur des souris suivant un régime alimentaire standard ainsi que sur des souris soumises à un régime enrichi en graisse.

Le régime riche en gras va entraîner une obésité et une résistance à l'insuline qui permettra de reproduire un état pré-diabétique.

Si notre hypothèse se vérifie, les souris CD63 KO devraient présenter une réponse aux tests métaboliques améliorée par rapport aux animaux contrôles, surtout après le régime enrichi en graisse

Le rôle de la protéine CD63 dans l'apparition du diabète de type 2, et plus généralement dans le métabolisme, n'a jamais été étudié. La régulation de la glycémie nécessite la participation de plusieurs organes interdépendants (foie, îlots de Langerhans, muscles, tissus adipeux, cerveau). Ces mécanismes complexes ne sont présents que dans des organismes complexes tels la souris. Les observations que nous allons faire sur les animaux permettront donc de compléter, de corroborer et de valider dans un contexte physiologique des mécanismes observés *in vitro* sur des cellules en culture. Par conséquent, dans notre cas nous ne pouvons pas remplacer la souris comme modèle.

Nous utiliserons un total de 100 souris réparties en 4 groupes de 25 souris. Ce nombre est nécessaire pour mettre en évidence de manière fiable, en éliminant les variations individuelles, les phénotypes métaboliques. Des variations individuelles pourraient en effet apparaître en raison du fond génétique mixte de cette lignée. Par ailleurs, ce projet constituant une première étude métabolique sur cette lignée de souris (les souris CD63 KO n'ont jamais été caractérisées d'un point de vue métabolique) nous testerons des groupes relativement importants pour être sûrs que les variations individuelles ne masquent pas un éventuel phénotype. Par souci de réduction du nombre d'animaux, nous procéderons aux différents tests sur les mêmes animaux.

Des analyses statistiques (test de Student et ANOVA) seront réalisées pour comparer les réponses des différents groupes aux tests métaboliques.

Nous raffinerons nos expériences afin d'éviter le stress des animaux lors des différents tests: ils seront réalisés par du personnel qualifié, les animaux seront habitués à la manipulation par l'expérimentateur plusieurs jours avant de les tester, un antalgique local sera appliqué pour éviter l'inconfort lié aux prélèvements sanguins, les volumes prélevés seront faibles et les volumes de glucose injectés seront proportionnels au poids de chaque animal.

5521. Les cellules souches pluripotentes sont de cellules très immatures capables de donner tous les types de cellules du corps humain en grande quantité. Ces cellules ont un grand intérêt thérapeutique, car elles peuvent produire des cellules spécialisées afin

de remplacer dans un organisme les cellules mortes ou malades. En particulier, l'obtention de cellules hématopoïétiques (sanguines) et des vaisseaux dérivés des cellules souches pluripotentes humaines serait d'une grande utilité pour disposer de beaucoup de cellules à greffer pour des maladies telles que les leucémies ou d'autres maladies sanguines ou touchant le système vasculaire.

Les cellules pluripotentes appelées « cellules souches embryonnaires » (ES) ont été dérivées de l'embryon humain aux tout premiers stades de son développement, quelques jours après la fécondation. *In vitro*, ces cellules dites "pluripotentes" peuvent donner des cellules à l'infini et se différencier en plus de 200 types de tissus différents. En 2012, le Prix Nobel de Médecine a été attribué au professeur Yamanaka pour avoir découvert que des cellules spécialisées (matures) d'un organisme adulte pouvaient être reprogrammées afin de redevenir pluripotentes, comme les cellules souches de l'embryon. Ces cellules ont été appelées « cellules souches pluripotentes induites » (iPS) elles peuvent à leur tour se différencier vers tous les tissus de l'organisme comme les cellules ES. Cette technologie permet de disposer d'un nombre infini de cellules provenant du même patient et envisager une thérapie personnalisée sans problème de rejet de la greffe.

La transplantation de cellules hématopoïétiques en vue des traitements des leucémies ou d'autres maladies sanguines, nécessite une grande qualité des cellules, provenant soit du sang de cordon ombilical, soit de sang périphérique, soit de moelle osseuse, cellules qui doivent être compatibles avec le patient. Bien qu'aujourd'hui il existe des banques des cellules, utilisables pour la greffe de moelle osseuse, les besoins en cellules hématopoïétiques restent importants. De même, pour les malades atteints d'ischémie, les cellules endothéliales à greffer proviennent aussi de ces 3 sources et nécessitent aussi un nombre important des cellules à greffer.

Les cellules souches pluripotentes humaines : cellules ES et iPS, peuvent donner un type de cellule (appelée l'hémangioblaste) qui peut se différencier à la fois en cellules hématopoïétiques et endothéliales. Notre projet est de produire des cellules sanguines et endothéliales fonctionnelles en grande quantité à partir l'hémangioblaste. Nous maîtrisons la différenciation des cellules ES et des iPS vers l'hémangioblaste et l'engagement de ces dernières vers les cellules sanguines et endothéliales *in vitro*. Cependant, la preuve irréfutable que nous obtenons les bonnes cellules à partir des cellules souches embryonnaires humaines (ES et iPS), est que ces cellules aient la capacité d'une part, de reconstituer le sang de patients et d'autre part, de former des vaisseaux après une occlusion de la circulation sanguine. Des expériences chez la souris sont indispensables car jusqu'à présent la greffe de cellules hématopoïétiques et la revascularisation d'un site lésé sont de processus multiparamétriques et impossible à reproduire *in vitro*. En conséquence, avant de pouvoir utiliser ces cellules chez les malades il est indispensable de les tester chez la souris car pour les études de greffe de cellules humaines la souris est le modèle de référence.

Les expériences *in vivo* (reconstitution hématopoïétique et d'ischémie) seront réalisées seulement avec les lignées de cellules ES et iPS validés au préalable *in vitro*. Nous veillerons à ne pas utiliser plus d'animaux que le strict nécessaire pour nos expériences. Dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux utilisés, 8 groupes de cellules seront étudiées, dérivés de 3 lignées de ES (H1, H9 et SA01) et de 5 lignées d'iPS, auxquels se rajoutent 2 groupes contrôles à savoir le PBS (témoin négatif) et des cellules isolées de sang de cordon ombilical (témoin positif). Nous estimons à 548 le nombre de souris qui seront utilisées pour notre projet (la durée du projet est estimée à 4 ans). Les animaux seront surveillés tous les jours au début de l'expérience puis un suivi hebdomadaire, ou plus fréquemment si besoin, afin de déceler s'il y a des signes de souffrance

Les deux protocoles se réaliseront sous anesthésie pour réduire le stress et la souffrance subis par les souris et faciliter leur manipulation. Dans tous les cas, les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental sous forme de cocons. Des boîtes de « diet » gel seront à leur disposition pour favoriser l'accès à la nourriture. Ainsi l'ensemble des procédures sera réalisé dans le respect de la règle des 3R et du bien-être de l'animal.

5522. Le virus Zika (ZIKV) est un *arbovirus* (transmission principalement par les moustiques de type *Aedes*) découvert en 1947 qui est aujourd'hui particulièrement médiatisé en raison de son implication dans une épidémie majeure qui a débuté en 2015 et dont l'épicentre se situe en Amérique Latine, principalement au Brésil. Dans la majorité des cas (70 à 80 %) l'infection est asymptomatique, cependant chez certains patients une fièvre modérée, une éruption cutanée, des conjonctivites et des douleurs musculaires peuvent apparaître. De façon plus inquiétante, des complications neurologiques ont été mise en évidence, en particulier des cas de microcéphalies résultant probablement de l'infection par le virus de femmes au premier ou au deuxième trimestre de grossesse. Par ailleurs des syndromes de type Guillain-Barré (associé à une démyélinisation) ou des inflammations de l'encéphale ont également été répertoriés chez des patients dont l'infection est avérée. L'ampleur de l'épidémie actuelle laisse apparaître l'état très limité des connaissances concernant la physiopathologie de ce virus. Ainsi un effort à l'échelle mondiale est en train d'être entrepris afin de caractériser au plus vite l'interaction moléculaire de ce virus avec les cellules humaines mais également de développer des tests diagnostiques spécifiques et des approches vaccinales.

Le virus Usutu (USUV) est également un *arbovirus*, présent aussi chez certains oiseaux tels que les merles ou les corbeaux. Proche phylogénétiquement du virus ZIKV, contrairement à ce dernier, ce virus émergent découvert en 1959 en Afrique du Sud n'est, pour l'heure, pas impliqué dans des épidémies chez l'Homme, mais des cas sporadiques ont été rapportés en Afrique et plus récemment en Europe incitant à la prudence concernant l'émergence de ce virus chez l'Homme.

Notre équipe a obtenu des résultats intéressants sur le potentiel neurotropique de ces deux virus émergents en utilisant des cultures *in vitro* de cellules neuronales (cellules souches neuronales, neurones moteurs, astrocytes). Il reste maintenant notamment à confirmer ces résultats sur des modèles *in vivo*, indispensables pour valider nos observations afin notamment de mettre en évidence un éventuel transport axonal de ces virus ainsi que d'étudier leur rôle dans le déclenchement d'un processus inflammatoire et dans la dégénérescence axonale associés à certains cas cliniques. L'objectif principal de notre travail est de mieux comprendre les neurotropismes de ces deux virus et les voies d'accès au système nerveux central.

Notre projet doit inclure 145 animaux. Les animaux seront manipulés en confinement A2 en respectant les règles en vigueur dans l'animalerie d'accueil (portoirs ventilés suivant les manipulations effectuées, traitement de la litière comme déchets infectieux, formation du personnel manipulant les animaux ...)

Afin de correspondre à la règle des 3R nous mettrons en place les procédures suivantes :

1. Remplacement

Une partie du projet sur modèles cellulaires (astrocytes, neurones moteurs, cellules souches neuronales, microglie) a été dans le but d'effectuer une première identification des gènes potentiellement impliqués dans le neurotropisme et l'inflammation initiée par ZIKV et USUV. Ces gènes candidats seront étudiés en priorité sur nos animaux. Le transport axonal sera également étudié *in vitro* en utilisant des chambres microfluidiques permettant de compartimentaliser le corps cellulaire du neurone de son axone.

2. Réduction

- Les données seront analysées par un biostatisticien afin de minimiser le nombre d'animaux.

Par ailleurs les mêmes animaux seront utilisés pour effectuer à la fois les analyses histochimiques et biochimiques. Les expériences d'injections et le sacrifice des animaux seront toujours effectuées par le même utilisateur afin de limiter la variabilité expérimentale et minimiser le nombre d'animaux utilisés. Les moelles épinières et nerfs sciatiques disséqués pourront aussi être observés en IRM de diffusion *ex vivo* afin d'évaluer le degré de démyélinisation.

3. Raffinement

- La procédure la plus douloureuse de ce projet est l'injection dans le nerf sciatique des virus ZIKV et USUV. Elle sera effectuée sous anesthésie à l'isoflurane 2.5%.

Les opérations seront réalisées le matin afin de surveiller le réveil et l'état des animaux jusqu'en début de soirée. L'évaluation clinique de chaque souris sera réalisée par le responsable tout au long de l'expérience.

-Le palier de douleur prévisible à une injection dans le nerf sciatique est de degré 2 (modéré) car les douleurs post-opératoires sont estimées d'intensité moyenne sur une période courte. Nous utiliserons comme analgésique la buprénorphine à la dose de 0,1 mg/kg en sous cutanée. La buprénorphine devrait agir environ 6h, avec une première injection le matin lors de l'acte chirurgical, permettant ainsi de refaire une injection le soir s'il y a manifestation de douleur.

Tout animal présentant des signes de morbidité sera exclu de l'expérience et immédiatement euthanasié par injection létale de pentobarbital avant la fin de l'expérience. Afin de déterminer le point limite de notre expérience aboutissant au sacrifice de nos animaux nous nous baserons sur un ensemble d'observations pour l'évaluation de la souffrance, de la détresse et de l'inconfort des animaux de laboratoire, en se basant sur l'évaluation de 4 aspects de l'état d'un animal :

1. Variation du poids de l'animal (et variations connexes au niveau de l'ingestion de nourriture et d'eau). Tous les animaux subissant une perte de poids de plus de 20% seront sacrifiés. Notre étude s'effectuant sur le court terme, il ne devrait pas y avoir de perte de poids conséquente chez nos animaux.

2. Apparence physique externe. Incluant notamment l'aspect du poil des animaux.

3. Signes cliniques mesurables. Exemples : changements du rythme cardiaque, du rythme respiratoire et de la nature de ceux-ci.

4. Changement dans les comportements non provoqués. Observation de la prostration éventuelle de l'animal dans la cage.

5523. Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies et dystrophies) 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 comment les mutations génétiques 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, nous prévoyons d'utiliser 2 modèles murins pour la dystrophie musculaire de Duchenne (des souris mdx-/y et des souris double knock-out dystrophine/utrophine).

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus fréquente des maladies musculaires chez les enfants. La DMD est une maladie sévère liée à l'X avec une atrophie et une faiblesse musculaire progressive, affectant presque tous les muscles, et résultant normalement d'une mort prématurée due à des défauts cardio-respiratoires. Malgré des recherches approfondies sur les thérapies pour la DMD ciblant l'expression de la dystrophine, aucun traitement effectif n'a encore été développé pour cette maladie.

Ainsi, les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées *in vivo* / *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures. Plusieurs procédures expérimentales (maximum une/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris. 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et ainsi, 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).

Un maximum de 2400 souris sera utilisé.

5524. Le cancer est la principale cause de décès en France depuis 2003 avec une incidence qui ne cesse d'augmenter. La recherche dans ce domaine a déjà permis de mieux comprendre les mécanismes d'apparition et de progression de cette maladie complexe. La plupart des traitements utilisés en thérapie anticancéreuse présente encore une forte toxicité systémique du fait d'une distribution non spécifique du principe actif dans l'organisme. Très souvent, on voit également se développer des phénomènes de résistance aux traitements avec peu ou pas d'alternative thérapeutique à proposer au patient.

L'incorporation des principes actifs dans des systèmes nanométriques (millardième de mètre), appelés nanoparticules, a permis d'apporter de l'espoir ainsi que des solutions concrètes aux divers échecs des thérapies anticancéreuses actuelles.

Cependant, lorsque ces nanoparticules sont administrées par voie intraveineuse, les protéines plasmatiques vont s'adsorber à leur surface (phénomène d'opsonisation) et vont les désigner comme étant des corps étrangers, exactement comme elles le feraient avec des bactéries ou des virus. Les nanoparticules sont donc rendues vulnérables aux macrophages du foie, de la rate et de la moelle osseuse, et vont ainsi être phagocytées (c'est-à-dire capturées, ingérées et digérées), ce qui conduit à leur élimination rapide de la circulation sanguine.

Afin d'éviter cette capture par les macrophages, il est nécessaire d'empêcher l'opsonisation. Dans cette optique, la surface des nanoparticules peut être recouverte de polymères hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG, on parle alors de « PEGylation ») qui, par un effet de répulsion va empêcher l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules. Après administration intraveineuse, ces nanoparticules « PEGylés » vont avoir un temps de circulation dans le sang prolongé et leur capture par les macrophages sera fortement réduite.

Toutefois, il a récemment été démontré que le PEG pouvait entraîner des réactions immunitaires sévères chez certains patients, pouvant même aller jusqu'à des chocs anaphylactiques. Cette hypersensibilité de l'organisme après administration de nanoparticules recouvertes de PEG réduit donc fortement leur utilisation généralisée dans le cadre des thérapies anticancéreuses du fait d'un risque trop élevé vis-à-vis de la santé des patients.

Dans ce contexte, d'autres polymères ont été proposés comme alternative au PEG afin d'augmenter le temps de circulation des nanoparticules tout en évitant les problèmes qui lui sont associés. Cette démarche s'inscrit dans une logique d'étude de nouveaux vecteurs thérapeutiques qui peuvent être chargés en principes actifs en vue de leur utilisation chez l'Homme.

Notre approche expérimentale vise donc, dans un premier temps, à étudier le temps de circulation plasmatique, ainsi que la distribution dans le foie et la rate (*via* des études de pharmacocinétique et de biodistribution) des nanoparticules présentant à leur surface de nouveaux polymères comme alternative au PEG, après injection intraveineuse chez le rat. Dans un deuxième temps, nous étudierons la production d'immunoglobulines (protéines du sang produites par les cellules du système immunitaire en réponse à la pénétration d'un corps étranger dans l'organisme) suite à l'injection des nanoparticules. Les immunoglobulines jouent un rôle essentiel dans la défense de l'organisme contre les agressions (bactéries, virus, parasites, champignon, etc.), mais elles peuvent ici entraîner la destruction des nanoparticules et par conséquent conduire à une baisse significative de leur efficacité thérapeutique.

Ce projet nous permettra de vérifier la pertinence et d'évaluer la performance des nouveaux polymères choisis comme alternative au PEG. Il représente une étape indispensable à la découverte de nouveaux vecteurs thérapeutiques avec une efficacité accrue et à la mise en place d'études cliniques. Malgré des efforts constants dans le développement de méthodes alternatives pour limiter le recours à l'expérimentation animale, l'étude du remplacement du PEG ne peut se faire qu'au travers d'une étude *in vivo*, sur un organisme entier qui reproduira un système immunitaire complexe et complet.

Les études préliminaires *in vitro* ont permis le criblage de différentes formulations et un nombre limité de polymères (seulement 3 parmi 20 étudiés) sera testé *in vivo* chez le rat, ce qui permet une réduction du nombre d'animaux utilisés. Ce nombre est aussi réduit grâce à une planification statistique minutieuse qui permettra l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également respecté. Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance ou angoisse que pourraient ressentir les animaux. Des méthodes d'anesthésie sûres et efficaces seront utilisées pour exécuter toute intervention douloureuse.

Au final, sur 2 ans, 544 animaux seront utilisés pour mener à bien ce projet.

5525. La mise au point de médicaments ou de compléments alimentaires destinés aux animaux nécessite une phase de galénique, c'est à dire de détermination de la formulation de manière à ce que les concentrations sanguines des constituants actifs de ces produits soient suffisamment élevées et durables pour être efficaces. Des études antérieures devront avoir fourni des éléments démontrant l'innocuité des produits aux dosages utilisés ainsi qu'établi une concentration plasmatique cible.

Dans le présent projet, des animaux de différentes espèces se voient administrer une préparation par la voie prévue pour l'usage ultérieur puis ils subissent une série de prélèvements sanguins (7 à 10) afin de mesurer la concentration des produits actifs dans leur sang.

Si les études de toxicité et d'efficacité peuvent dans une certaine mesure être réalisées soit sur des cultures cellulaires soit sur d'autres espèces animales, comme les rongeurs, les dernières étapes de la mise au point de nouveaux traitements pour les animaux nécessitent de mener des études sur les préparations définitives dans l'espèce à laquelle elles sont destinées, comme cela est réalisé avec des volontaires sains chez l'Homme.

Bien que les données de toxicologie et de pharmacologie des produits testés dans ce projet soient souvent bien connues soit chez d'autres mammifères, soit dans l'espèce cible elle-même, et que le risque d'effets adverses soit minime, les animaux utilisés ici bénéficieront de fait d'une surveillance extrêmement rapprochée puisqu'ils seront manipulés à chaque prélèvement sanguin et que des effets toxiques imprévus seront aisément détectés à cette occasion. Les produits testés ici seront notamment sélectionnés pour ne pas avoir d'effets durables sur les animaux. De ce fait, le nombre d'animaux pourra être réduit, chaque animal étant son propre témoin après une période correspondant environ à 10 fois la durée d'élimination du produit testé et de ses métabolites actifs lorsque plusieurs préparations ou doses sont comparées, ce qui est le cas le plus fréquent. De même, les animaux seront gardés en vie et réutilisés pour d'autres projets ou proposés au placement, le cas échéant.

Nous envisageons de tester ces produits sur des groupes de 6 animaux (chiens, porcs, chats, moutons et lapins), ce type d'essai pourrait être reproduit trois fois par an ce qui représente un nombre d'animaux total de 90 sur les 5 années couvertes par ce projet.

5526. Notre département d'enseignement forme en 3 ans des ingénieurs pluridisciplinaires destinés principalement aux industries de la Santé, des Biotechnologies, et de l'Agro-alimentaire. Il gère deux filières de spécialisation:

- Biochimie et Biotechnologies: formation scientifique et technique aux sciences de la vie et de la santé, aux sciences de l'ingénieur et à plusieurs domaines de la chimie,

-Bio-Informatique et Modélisation: formation située à l'interface des sciences du vivant, des mathématiques et de l'informatique.

La majorité des élèves ingénieurs qui intègrent le département Biosciences ont suivi deux années de formation aux sciences de l'ingénieur. Les autres sont admis au terme d'une première formation à l'étranger.

Plus de la moitié (55 %) de nos étudiants trouvent leur premier emploi dans le secteur pharmaceutique ou parapharmaceutique, les enseignements de physiologie (fonctionnement de l'organisme humain) et de pharmacologie (connaître le médicament) occupent donc une place très importante dans la formation de nos ingénieurs. La physiologie y est abordée comme un prérequis nécessaire à la compréhension de la physiopathologie et aux enseignements de pharmacologie.

Les enseignements pratiques de physiologie et de pharmacologie expérimentale (pour un volume horaire total de 104h par étudiant) ont pour objectif d'initier les étudiants à l'expérimentation animale, d'en connaître les contraintes éthiques et réglementaires et d'en comprendre les limites (notamment en ce qui concerne les différences inter-espèces et la transposabilité des résultats obtenus à l'Homme). C'est l'occasion pour les étudiants d'acquérir un savoir-faire opérationnel et une réelle autonomie en expérimentation animale. Ces enseignements de travaux pratiques sont en outre l'opportunité d'illustrer les grands chapitres du cours de physiologie et de pharmacologie.

Les travaux pratiques nécessitent pour 168 étudiants présents (2 filières, 3 années de formation) l'utilisation moyenne de 80 souris, 100 rats et de 8 lapins par année universitaire soit un total sur 5 ans de 940 animaux. Le principe des 3R a été pris en compte pour les enseignements pratiques de physiologie et de pharmacologie par 1- la réduction du nombre de séance d'expérimentation animale (réduction du volume horaire), 2- le développement d'études sur organes isolés qui permettent de réduire le nombre d'animaux à où cela est strictement nécessaire (1 rat permet le travail de 8 étudiants), 3- l'utilisation d'enseignements assistés par ordinateur (EAO avec le logiciel de simulation Cardiolab pour l'étude de la pharmacologie cardiovasculaire) et l'utilisation d'analgésiques appropriés.

5527. La prévalence de l'obésité est en constante augmentation au niveau mondial (OMS), de même que les maladies qui lui sont associées (maladies cardiovasculaires, diabète...), ce qui contribue à intensifier les recherches permettant d'en comprendre les causes et de trouver les traitements adaptés. L'obésité résulte d'un déséquilibre entre les apports (alimentation) et les dépenses (exercice physique..) d'énergie. Cette « balance énergétique » est contrôlée en grande partie par le système nerveux central (cerveau, moelle épinière..), au sein duquel le bulbe olfactif (BO) joue un rôle important dans l'initiation de la prise alimentaire. Chez l'humain et l'animal, la sensibilité olfactive varie en fonction de l'état métabolique (mince ou obèse) et de l'état nutritionnel (nourri ou à jeun), et cela influence le comportement alimentaire. En effet, la sensibilité aux odeurs -notamment alimentaires- est très développée à jeun, ce qui stimule la consommation de nourriture, et elle est réduite après un repas. Chez un individu obèse, cette sensibilité olfactive est altérée et peut se traduire par une surconsommation alimentaire qui aggrave la maladie.

La prokinéticine 2 (PK2) est une protéine sécrétée, indispensable au développement du BO et il a été récemment montré chez le rongeur qu'elle inhibe la prise alimentaire lorsqu'elle est injectée dans le cerveau. Nous souhaitons déterminer si PK2 dans le BO joue également un rôle dans la régulation des comportements olfactif et alimentaire qui sont étroitement liés.

Cette thématique nécessite l'utilisation de modèles animaux, les mesures des prises alimentaires et les tests métaboliques et olfactifs ne pouvant se faire *in vitro*. La souris est un modèle d'étude des comportements olfactif et alimentaire validé par la communauté scientifique internationale.

En nous limitant à un panel statistiquement représentatif, 928 souris seront utilisées sur la durée du projet. Nos protocoles ont été mis au point de façon à veiller au bien-être animal en améliorant leur environnement et en surveillant leur état de santé ; notamment nous chercherons à éviter/limiter la douleur/souffrance, à assurer des soins pré-, per- et postopératoires adéquats, à recourir à l'anesthésie/analgésie, à appliquer les points limites établis préalablement et à utiliser les procédures de mise à mort appropriées.

5528. L'obésité et le diabète de type 2 peuvent être considérés comme des troubles du fonctionnement cérébral. En effet, la régulation de la balance énergétique repose sur la capacité du cerveau à fournir une réponse adaptée aux variations des facteurs circulants de satiété et de faim reflétant le statut énergétique de l'organisme. Deux hormones métaboliques circulantes, l'insuline et le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) pourraient jouer un rôle crucial dans ce mécanisme, toutefois, il existe très peu de données sur les mécanismes possibles de leur entrée et de leur action sur le cerveau.

Le cerveau est protégé par la barrière hémato-encéphalique, qui régule le passage des molécules du sang vers le cerveau. Au niveau de l'hypothalamus, structure cérébrale centrale de la régulation de la prise alimentaire, ces échanges sont régulés par une structure appelée l'éminence médiane où la fonction de barrière hémato-encéphalique est assurée par la présence de capillaires fenestrés (c'est à dire percés de micropores et donc plus perméables) et de cellules spécialisées appelées tanocytes.

Le but de ce projet est de tester 2 hypothèses :

- L'insuline et le GLP1 entrent dans le cerveau grâce aux tanocytes.

- L'entrée d'insuline et de GLP1 influence l'état métabolique.

Dans ce projet nous utiliserons des souris contrôles et des souris génétiquement modifiées pour lesquelles il est possible d'activer et de faciliter le transport de molécules spécifiquement au niveau des tanocytes.

Ces études seront réalisées *in vivo*, et se basent sur des processus vasculaires et des modifications métaboliques qui ne peuvent pas être répliqués sur des cultures de cellules. Il n'est actuellement pas possible de remplacer ce type de protocole par des modèles "*in silico*".

Sur les 5 années du projet, nous utiliserons un total de 524 souris, nous essayerons de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés.

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.

5529. Il s'agit d'une étude non clinique (et non BPL) de tolérance précédant une étude clinique en médecine comparative sur patients chiens atteints de tumeurs malignes non opérables en vue de l'initiation d'une phase I chez l'homme.

Les objectifs de cette étude visent à déterminer la dose maximale tolérée du virus oncolytique VSV-GP chez le chien Beagle sain. Cette étude vise également à déterminer la titration de la charge virale dans les excréta, et la réponse humorale spécifique au virus VSV-GP.

Le VSV-GP est un Organisme Génétiquement Modifié (OGM). Il s'agit d'une forme recombinante atténuée du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) de la souche *Indiana*, atténuée par délétion de la glycoprotéine (G) de VSV, et exprimant la glycoprotéine (GP) du Virus de la ChorioMéningite Lymphocytaire (VCML) de la souche WE-HPI.

Le modèle animal retenu pour cette étude est le chien de race Beagle. Un total de 4 chiens sains, males d'âge adulte (de 8 à 15kg), participera à cette étude constituée de deux étapes :

- une première étape d'escalade de doses, d'une durée totale de 63 jours, menée sur 2 chiens visant à déterminer la dose maximale tolérée du virus oncolytique,

- et une seconde étape, d'une durée de 42 jours, menée sur 2 autres chiens visant à déterminer la titration de la charge virale dans les excréta et la réponse humorale spécifique au traitement à la dose maximale tolérée.

Ce protocole a été développé dans un respect maximal de la règle des 3R mais cette étape *in vivo* est indispensable pour la poursuite du programme de développement du produit. Il est en effet primordial, avant de mener une première étude clinique d'efficacité chez le patient chien atteints de tumeurs malignes, de pouvoir :

- d'une part, déterminer la dose maximale tolérée du produit chez l'espèce cible,

- et d'autre part, de confirmer que les particules virales ne sont pas présentes dans les excréta des animaux à différents temps après injection de l'OGM.

L'objectif étant de pouvoir permettre une réhabilitation des animaux à la fin du présent protocole expérimental, et également de déterminer le temps d'hospitalisation en milieu de confinement C2 qui sera nécessaire avant que l'animal ne puisse retourner chez son propriétaire lors de l'étude clinique d'efficacité chez le patient chien.

Le nombre d'animaux utilisé est réduit au minimum. Les procédures expérimentales réalisées dans le cadre de cette étude présentent un degré de gravité léger. Des points limites ont été définis, et sont décrits dans la suite de ce document. De plus, à l'issue de cette étude, si l'état de santé des chiens est certifié favorable par un vétérinaire, et après accord de la DDPP, ces derniers pourront faire l'objet d'une réhabilitation par une association agréée.

5530. Notre équipe travaille sur les cellules souches pluripotentes humaines depuis presque 10 ans. Pionniers dans l'utilisation et la création de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh), notre équipe sert de support à plusieurs laboratoires utilisant également les CSEh comme modèle d'étude. Dans ce cadre nous distribuons plusieurs lignées de CSEh aux laboratoires partenaires. Conformément à la réglementation, avant libération, les lignées de CSEh doivent être qualifiées qualitativement selon plusieurs critères qui ont été défini par un groupe d'expert international dans le domaine des cellules souches (International Stem Cell Initiative). Dans ce cadre nous devons réaliser un test de formation de tumeur bénigne (tératomes) après injection dans des souris immunodéficientes. Ce test s'applique également aux lignées de cellules souches pluripotentes induites (iPS) dont les propriétés sont très similaires à celles des CSEh. Depuis 2008, nous avons dérivé avec succès plus de 50 lignées d'iPS provenant chacune de donneurs différents. Avant libération, les lignées d'iPS suivent exactement le même processus de qualification que les CSEh ce qui implique leur validation lors de tests de formation de tératomes dans des souris immunodéficientes.

Pour ce programme nous observons la règle des 3 R notamment en ce qui concerne la réduction du nombre d'animaux au strict minimum. Seules les lignées ayant passé la première série de validation (expression des marqueurs de surface et caryotypes) seront utilisées dans le test de formation des tératomes. Dans ce cas l'efficacité de formation de tumeurs est proche de 100% nous conduisant à utiliser un seul animal par lignée de cellules souches pluripotentes à valider. Sur la durée du projet nous estimons devoir valider annuellement les lignées existantes puis celles nouvellement produites. La souffrance subie par les animaux est estimée comme modérée ce qui induira une surveillance particulière des animaux (administration éventuelle d'une analgésie) au cours des 6-8 semaines d'expérimentation. Pour ce programme de recherche nous utiliserons au total 750 souris (150/an sur 5 ans) immunodéficientes du fond génétique NSG.

5531. La transplantation d'organes est la thérapie principale permettant de palier à la défaillance de certains organes. La transplantation de rein est historiquement la première greffe à avoir été réalisée et, depuis, le rein est l'organe le plus greffé. La transplantation rénale est la meilleure thérapie de l'insuffisance rénale chronique en améliorant de manière significative la durée et

la qualité de la vie des patients, tout en permettant de réduire considérablement les coûts liés au traitement de l'insuffisance rénale par la dialyse. Cependant, le manque actuel de greffon et la diminution de leur qualité (donneurs âgés et aux multiples comorbidités) sont des problèmes majeurs limitant cette thérapeutique.

La thérapie cellulaire est une technique qui a fait l'objet de nombreux essais cliniques dans de nombreux domaines de la médecine. Certaines de ces études ont nettement démontré les effets de cellules souches notamment celles issues du tissu adipeux sur la réparation et la régénération de tissus et d'organes ainsi que sur la modulation de la réponse immunitaire.

Dans le but d'élargir le nombre de greffon disponibles et d'améliorer leur devenir, nous proposons dans cette étude d'évaluer le potentiel thérapeutique de cellules souches issues du tissu adipeux dans un modèle préclinique. Notre hypothèse est que ces cellules pourraient limiter les lésions du greffon causées par l'ischémie-reperfusion survenant entre le prélèvement du rein et sa transplantation et ainsi optimiser la survie de ces greffons.

Le modèle serait le modèle porcin d'autotransplantation rénale. Les cellules seraient injectées lors de la greffe lors de la revascularisation du greffon après sa conservation *ex vivo*.

Le protocole chirurgical est réalisé chez des porcs de 30-40kg sous anesthésie générale pour toutes ses étapes. Entre les interventions, les animaux seront suivis et leur analgésie sera assurée à tout moment. Pour mimer les conditions rencontrées en clinique, où les organes sont lésés par la période se déroulant entre leur prélèvement et leur transplantation, le protocole sera composé successivement de :

- d'un prélèvement de graisse au niveau abdominal de l'ordre de 20g, 15 jours préalablement au prélèvement du rein et à sa transplantation

- d'un clampage de l'artère rénale réalisant un arrêt de la circulation sanguine au niveau du rein gauche pendant une heure puis du prélèvement de ce même rein suivi de sa conservation pendant 24h à froid

- de la transplantation de ce greffon sur le même animal (autotransplantation). Durant ce dernier temps opératoire, le rein droit est prélevé pour laisser seulement fonctionnel le rein greffé.

- Les cellules issues du tissu adipeux prélevé 2 semaines au préalable à transplantation sont injectées dans l'artère rénale du greffon.

- Le suivi de l'animal se fera ensuite pendant 3 mois. Ceci permettra d'évaluer l'effet de ces cellules sur la reprise de fonction du greffon et sur l'apparition de lésions rénales chroniques.

Seront testés quatre groupes expérimentaux avec 32 animaux au total:

- 8 porcs ayant une injection de cellules (1 million de cellules/Kg de poids)

- 8 porcs ayant une injection de cellules (1 million de cellules/Kg de poids) et recevant un traitement immunosuppresseur d'une durée de 3 mois, afin d'évaluer l'effet de ce traitement sur la thérapie cellulaire

- 8 porcs recevant une injection de solution vectrice sans cellule ni traitement immunosuppresseur

- 8 porcs recevant une injection de solution vectrice sans cellule mais recevant le traitement immunosuppresseur d'une durée de 3 mois.

Ce projet prend en compte la règle des 3R.

Cette thérapie régénérative ne peut être remplacée par des modèles cellulaires en raison des très nombreux types cellulaires composant le rein et de la complexité des mécanismes induits par la transplantation rénale.

Ainsi, ce projet ne peut être évalué que dans un modèle *in vivo* chez l'animal tant pour la faisabilité du prélèvement de graisse que pour l'aspect préclinique retrouvé seulement chez le gros animal comme le porc. Le nombre d'animaux par groupe sera réduit au minimum (n=8) pour permettre une analyse statistique des résultats.

Le raffinement de cette étude a également été mis en avant en hébergeant les animaux dans des locaux adaptés à proximité de leurs congénères permettant de les voir et les sentir. De plus, la chirurgie ainsi que le traitement anesthésique et analgésique a été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire au minimum la souffrance des animaux, et une surveillance quotidienne des animaux permet d'évaluer et d'adapter au mieux la prise en charge, en particulier pour le traitement analgésique.

5532. L'amélioration de l'efficacité alimentaire est un enjeu économique et environnemental majeur de la filière porcine, permettant une réduction du coût alimentaire et des rejets par une meilleure utilisation des aliments par les animaux. Depuis 2000 une expérience de sélection pour les porcs a permis d'établir des lignées divergentes pour un critère d'efficacité alimentaire. Ces lignées servent à la fois à la compréhension de l'impact de la sélection pour une plus grande efficacité sur les performances de production et de reproduction des porcs, mais aussi à la compréhension des mécanismes sous-jacents et de leurs impacts sur la robustesse des animaux. Actuellement les deux lignées sont conduites en unité expérimentale sur un site principal (40 truies par lignée) et un site secondaire (16 truies par lignée).

Des aménagements du dispositif expérimental sur le site secondaire sont planifiés en 2017 pour mettre en place un nouvel élevage. Ces évolutions entraînent une modification des installations actuellement disponibles, faisant en particulier disparaître les bâtiments de reproduction conventionnels. Pour sauvegarder les lignées expérimentales dans leur intégralité, il est nécessaire de transférer les ressources génétiques présentes sur le site secondaire vers le site principal. Ce site, central dans le dispositif d'expérimentation en génétique porcine, est fermé, c'est-à-dire qu'aucune entrée d'animaux n'est autorisée. C'est une stratégie classique de régulation des mouvements dans les élevages de sélection, qui permet de limiter les risques liés à la biosécurité de l'élevage et de préserver les ressources génétiques qui y sont présentes.

L'utilisation de la technique de production d'embryons sur les truies (donneuses) et ré-implantation sur des truies receveuses (transfert) a été retenue pour transférer les ressources génétiques des lignées. Elle permettra de maximiser la diversité génétique

récupérée en minimisant les risques biologiques. Cette demande concerne les 32 femelles présentes sur le site secondaire (les donneuses), un second dossier concernant les receveuses hébergées sur un autre établissement utilisateur sera déposé.

La technique est maîtrisée dans l'établissement d'expérimentation, l'expertise est donc disponible sur cette biotechnologie. Pour des raisons anatomiques, à l'inverse des bovins et des équins, chez le porc la récupération des embryons ne peut pas être réalisée par les voies naturelles. Elle nécessite une intervention chirurgicale (laparotomie) sur femelles anesthésiées (les embryons étant réimplantés dans la journée par voie chirurgicale pour assurer un taux de réussite maximal du transfert).

La règle des 3R est prise en compte dans ce projet :

- Remplacer : le maintien de lignées expérimentales uniques issues de plus de 15 ans de sélection qui ne pourraient pas être conservées autrement et devraient le cas échéant être complètement reproduites si le transfert n'était pas effectué.
- Réduire : 1. l'utilisation de procédure de super ovulation pour maximiser le nombre d'embryons collectés permet de réduire le nombre de collectes sur les animaux impliqués, ce qui permettra de ne faire qu'un prélèvement par truie, 2. la procédure de réimplantation chirurgicale est opérationnelle, elle maximise le taux de réussite du transfert.
- Raffiner : La douleur est prise en compte par l'injection en intra musculaire d'un anti inflammatoire non stéroïdien pour compléter l'action de l'analgésique pré anesthésie.

5533. L'optimisation de la fonction visuelle au regard de l'alternance du jour et de la nuit est un paramètre important de l'adaptation à l'environnement. L'adaptation de la vision au cycle jour/nuit met en jeu une régulation fine, sur le cycle de 24h, de la physiologie rétinienne par une horloge circadienne endogène à ce tissu et synchronisée par l'alternance lumière/obscurité. Cette horloge est en réalité un réseau d'oscillateurs ou pacemakers, présents dans différents types de neurones rétiniens et fortement connectés entre eux. En revanche, les mécanismes par lesquels ces oscillateurs communiquent entre eux sont peu connus et en particulier le rôle des cellules gliales de Müller (CGM) dans ce réseau n'ont pas été investigués. Nous avons montré que les CGM contiennent également une horloge et notre projet vise à comprendre si cette horloge est importante pour le fonctionnement rythmique de la rétine dans son ensemble. Afin de répondre à cette question nous allons générer des souris recombinantes dans lesquelles l'horloge est génétiquement éteinte, spécifiquement dans les cellules gliales. Pour cela, nous croiserons 3 lignées : Flox-Bmal1 (possibilité d'éteindre le gène horloge Bmal1 par recombinaison entre sites LoxP) ; GLAST-CRE-ERT2 (expression d'une CRE recombinase inducible par le tamoxifène, dans les cellules gliales) ; Per2luciferase (possibilité de suivre les oscillations de l'horloge dans des explants de rétine en suivant l'expression du gène Per2). Cette approche permettra d'évaluer pour la première fois l'importance des fonctions rythmiques des cellules gliales vis-à-vis de l'horloge rétinienne mais aussi de la fonction visuelle, analysée par électrorétinographie. Le projet est basé sur l'utilisation de souris génétiquement modifiées de fond génétique C57Bl6J, un modèle de choix, actuellement, pour mesurer l'importance des horloges dans la physiologie, et qui ne peut être remplacé, en ce qui concerne un tissu et une fonction qui sont aussi complexes que la rétine et la vision, par des systèmes *in vitro* (principe de remplacement). Une partie des animaux seront sacrifiés et leurs yeux utilisés pour étudier l'horloge rétinienne d'une part et l'intégrité du tissu rétinien d'autre part. Les animaux chez qui l'électrorétinogramme sera enregistré seront suivis de façon longitudinale (mesures répétées) pour évaluer l'éventuelle dégradation progressive de la vision sous l'effet de la modification génétique induite, ce qui permettra de limiter le nombre d'animaux utilisés (principe de réduction). En raison de ce même principe, et au regard des analyses statistiques adaptée à ce type d'études, nous utiliserons un nombre maximal de 190 animaux. En ce qui concerne le principe de raffinement, les électrorétinogrammes seront réalisés sur animaux anesthésiés limitant le stress lié à la procédure sans interférer avec les mesures réalisées. Par ailleurs, les animaux seront hébergés en cages collectives contenant du matériel de nidation et un bâton à ronger.

Il est déjà connu que les cellules gliales jouent un rôle dans la genèse des rythmes dans l'horloge centrale hypothalamique mais cette question n'a jamais été posée en ce qui concerne la rétine, dans laquelle les cellules gliales de Müller ont une fonction centrale. Les animaux générés pour poser cette question dans l'horloge centrale présentaient une délétion de l'horloge dans les noyaux suprachiasmatiques, précisément. Ces modèles ne sont pas appropriés pour évaluer cette question dans la rétine et nos recherches bibliographiques indiquent que de telles expériences n'ont jamais été réalisées.

5534. Les poly-infections pulmonaires sont fréquentes chez les patients atteints de mucoviscidose, de bronchite chronique obstructive ou chez les sujets âgés. Elles impliquent plusieurs espèces de pathogènes pulmonaires, telles *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium abscessus*.

Afin d'étudier des aspects portant sur la virulence de ces pathogènes et sur la réponse immunitaire de l'hôte à ces infections, nous souhaitons développer un modèle d'infection chronique multiple à *P. aeruginosa*, *M. abscessus*, *S. aureus* et *B. cenocepacia* dans des souris C57BL/6, C3HeB/FeJ et des souris "Delta-F508" portant une mutation associée à la mucoviscidose chez l'homme. Le but du projet est d'évaluer si ces modèles sont pertinents lors d'infection avec des combinaisons de ces pathogènes, c'est-à-dire si ces pathogènes peuvent, seuls ou en combinaison, persister suffisamment longtemps (>2-3 semaines) dans l'organisme de l'hôte pour pouvoir en étudier les facteurs de virulence et l'immunité anti-infectieuse.

Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 3 étapes dans notre raisonnement.

Tout d'abord, les expériences réalisées *in vivo* sont basées sur des données épidémiologiques identifiant les quatre espèces microbiennes citées plus haut comme les pathogènes majeurs associées aux poly-infections pulmonaires (davantage de pathogènes pourraient être testés, nous avons choisi de nous concentrer sur les principaux). De plus, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARN, analyse de cytokines et charges bactériennes peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon). Finalement, notre équipe a une expertise dans l'utilisation de modèles animaux d'infection par *M. tuberculosis* (un

autre pathogène pulmonaire) et l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

Les souris sont infectées avec 4 combinaisons de pathogènes (Pa/Mab, Pa/Sa, Pa/Mab/Sa, Pa/Mab/Sa/Bc).

Pa = *P. aeruginosa*, Mab = *M. abscessus*, Sa = *S. aureus*, BC = *B. cenocepacia*.

Des groupes de 4 souris sont prélevés pour les jours 1 après infection, puis de 8 souris pour les jours 7, 14, 21, 42 et 90. Ceci conduit à un total de 44 souris par condition, soit 176 souris pour les 4 combinaisons testées. Ces combinaisons seront testées deux fois, soit un total de 352 souris. Cette expérience sera réalisée avec des souris de 3 fonds génétiques différents, conduisant à un total de 1056 animaux.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : lors de l'infection des animaux (sous anesthésie) et lors de l'inflammation pulmonaire chronique induite par l'infection. Ces deux situations douloureuses font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et pour la plupart déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

5535. Des troubles cognitifs, une désorientation spatiale et temporelle doit faire suspecter la maladie d'Alzheimer (AD). Cette maladie, tant redoutée, touche à ce jour 36 millions de personnes dans le monde et représente la principale cause de démence chez les personnes âgées. Ce nombre, en constante augmentation de par le vieillissement de la population, fait de cette pathologie un enjeu majeur de santé publique. Bien qu'il existe une forme héréditaire ou génétique (~ 1% des patients) de la maladie, les formes sporadiques multifactorielles représentent près de 99% des cas Alzheimer. Cependant, les modèles animaux disponibles à ce jour pour le développement préclinique des médicaments candidats restent essentiellement transgéniques et ne sont donc pas représentatifs de la forme sporadique de la pathologie. De ce fait, développer des nouveaux modèles non transgéniques de la maladie d'Alzheimer paraît primordial pour tester au mieux les médicaments candidats. La maladie d'Alzheimer est caractérisée par des altérations moléculaires du système nerveux central conduisant à la formation d'agrégats protéiques et, par conséquent, à une dégénérescence neuronale. Les analyses histologiques de cerveaux de patients montrent la présence anormale de plaques séniles et de neurofibrilles enchevêtrées.

Au cours d'études de criblage de molécules pouvant induire Alzheimer, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que les molécules identifiées sous le nom de "Aftins", entrant dans la composition des herbicides, induisaient une surexpression de protéine qui rentre dans la composition des plaques séniles. Ces résultats préliminaires, montrant des effets similaires à ceux décrits dans le cerveau des patients AD, suggèrent que les Aftins pourraient être un nouvel outil pharmacologique pour concevoir des modèles chimiques AD. L'objectif du présent projet vise à analyser les effets sur la cognition d'une exposition de mammifères modèles (souris) aux aftines et molécules dérivées. Il poursuit une étude préliminaire sur les conséquences biochimiques, moléculaires et histologiques. Dans cette étude préliminaire, nous avons montré que, contrairement à toute attente, une faible exposition aux Aftines entraîne une augmentation des capacités cognitives chez la souris.

Dans cette présente étude, nous voulons dans un premier temps, confirmer les résultats de cette première étude puis dans un 2ème temps, tester une concentration plus forte d'Aftines et évaluer les effets sur les capacités mnésiques des animaux. Cela permettra de comprendre le mécanisme d'action des Aftines, leur liaison avec la maladie d'Alzheimer et ainsi évaluer les risques d'une exposition forte en santé humaine. De plus, en cas de résultat montrant un effet délétère, pouvoir proposer un modèle chimique de la maladie d'Alzheimer.

Dans le déroulement de ce projet, nous avons pris en compte la règle des 3R.

- Remplacer : L'utilisation des modèles animaux dans le domaine de la maladie d'Alzheimer permet d'accroître la connaissance sur les origines, conséquences et le traitement de cette pathologie. De plus, cette pathologie ne peut s'étudier que sur un organisme entier étant donné la complexité de la physiologie du cerveau.

- Réduction: Les résultats de la première étude nous ont permis de déterminer le nombre minimum d'animaux utilisés pour pouvoir utiliser une statistique éprouvée, soit 48 animaux en tout.

- Raffinement: La chirurgie nécessaire pour cette étude sera réalisée sous anesthésie et un traitement post opératoire visant à réduire la douleur sera entrepris. Un suivi des animaux sera réalisé sur la totalité de l'expérience et un arbre décisionnel basé sur le reflet de la douleur chez la souris sera utilisé pour ne pas prolonger les souffrances éventuellement constatées.

Les résultats de cette étude sont importants pour la santé publique humaine pour déterminer le risque encouru en cas d'exposition aux Aftines et dérivés.

5536. L'adaptation des animaux aux conditions changeantes face à des ressources alimentaires et non-alimentaires fluctuantes est un enjeu majeur pour la Région Bretagne. La Bretagne est la 1ère région productrice de lait en France (20 % du total), et la filière laitière représente 20 % du chiffre d'affaire de l'agriculture des 4 départements bretons. Parmi les étapes d'élevage, la période la plus critique est l'élevage du jeune. Les conduites d'élevage des jeunes ruminants laitiers déterminent en partie leur niveau de production ultérieure. En élevage caprin, les difficultés à atteindre un poids vif supérieur à 35 kg lors de la mise à la reproduction amènent les éleveurs à augmenter la densité énergétique et protéique des rations avant la puberté. Ces pratiques suscitent de nombreuses interrogations quant aux régimes à utiliser, aux périodes durant lesquelles les distribuer et surtout sur les conséquences sur la reproduction et la production de lait. L'âge au sevrage est aussi un des critères importants dans la conduite et la gestion des élevages caprins, aussi bien du point de vue technique qu'économique. Les connaissances acquises sur la physiologie, la nutrition et/ou la reproduction des animaux depuis plusieurs décennies, ne sont plus en phase avec le terrain du fait de l'évolution génétique des troupeaux. Les conséquences de changement de pratiques d'élevage sur le comportement alimentaire, le besoin des animaux, les performances de reproduction et de production sont peu connues chez ces animaux. De telles données

permettront de mieux affiner les modèles et les recommandations pour ces animaux. Au final, 90 chevrettes nées cet hiver (février 2016) seront utilisées dans cet essai et permettront d'étudier les interactions entre l'âge au sevrage et le niveau d'alimentation pendant la croissance. Trois traitements alimentaires, formulés à partir des recommandations des instituts techniques, seront testés. Les mesures réalisées concernent les performances de croissance (poids,...), de production (quantité et qualité du lait), le développement de la glande mammaire, ainsi que les performances de reproduction (suivi des chaleurs).

Nous suivrons la règle des 3R :

Remplacer : il n'existe actuellement aucun autre modèle pour étudier la croissance chez cette espèce donc ce modèle chevrette est incontournable.

Réduire : 90 animaux sont nécessaires pour disposer d'un nombre suffisant d'animaux par traitement expérimental à la fin de la deuxième lactation. Il est important de tenir compte des pertes possibles (non reproduction, morts d'animaux, croissance insuffisante, accidents...).

Raffiner : toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers locaux, ainsi que par les différents intervenants, surtout entre la mise-bas et deux semaines après.

5537. Certaines maladies graves voire mortelles chez l'homme, telles que les cancers, peuvent être traitées par des médicaments d'origine chimique (chimiothérapies) ou biologique (protéines thérapeutiques, ex.: anticorps). De par leur mode d'action spécifique, ces médicaments nécessitent, au cours de leur développement, d'être préalablement testés chez le primate non humain lorsqu'aucune autre espèce d'animaux de laboratoire n'est utilisable par manque de prédictivité. C'est pour sa proximité génétique avec l'homme que le primate non humain est utilisé.

Ce projet regroupe les études envisagées chez des primates non humains, lors d'étapes de recherche et développement de nouveaux produits destinés à traiter des maladies graves ou mortelles chez l'homme, lorsqu'aucun autre test ou ensemble de tests ne peut les remplacer et qui concernent :

- la cinétique du produit testé (et/ou de ses produits de dégradation) dans le sang, le plasma, le sérum ou certains tissus d'intérêt,
- le suivi dans le temps de marqueurs d'activité ou de toxicité, solubles ou tissulaires,
- l'évaluation de la toxicité du produit testé et de ses produits de dégradation sur les grandes fonctions de l'organisme et sur certains tissus/organes cibles. Cette évaluation de la sécurité non clinique du médicament est une étape obligatoire requise par les autorités réglementaires, avant de tester ce médicament chez l'homme (essai clinique).

Le choix du primate non humain est restreint à des étapes spécifiques (non cliniques) du processus de mise au point de certains médicaments destinés à des pathologies graves chez l'homme. Le bénéfice attendu est directement lié à la proximité génétique des espèces utilisées avec l'homme, ce qui confère aux études réalisées un niveau de prédictivité inégalé et inatteignable par d'autres moyens : par exemple, la cible pharmacologique de certains médicaments n'est présente que chez l'homme et les primates non humains.

Il n'est pas possible de remplacer ces études puisque leur rationnel est basé sur l'impossibilité technique et scientifique d'obtenir des informations équivalentes par d'autres moyens que des investigations chez le primate non humain, avant les essais cliniques effectués chez l'homme. Par contre il est tout à fait possible de réduire le nombre d'animaux utilisés de différentes manières :

- en combinant plusieurs objectifs dans une même étude, par exemple la cinétique du produit testé et celle de biomarqueurs d'activité ou de toxicité,
- en réutilisant les animaux dans des projets (procédures) différents, lorsqu'il n'y a pas d'interférence entre les produits testés,
- en développant des techniques d'analyses sur de faibles volumes d'échantillons sanguins, ce qui autorise un nombre plus important de prélèvements sur un même animal, évitant ainsi le recours à des animaux supplémentaires, tout en respectant les recommandations relatives aux quantités prélevées.

Sur la base d'un nouveau projet tous les ans nécessitant l'utilisation de primates non humains, un maximum de 44 animaux par an sont nécessaires soit un total de 220 animaux sur 5 ans.

Le raffinement des études sur le primate non humain implique, au-delà de la prise en charge de la douleur par des mesures antalgiques appropriées, une phase de conditionnement des animaux nécessaire à une coopération accrue liée à une confiance réciproque qui s'instaure progressivement entre l'homme et l'animal, permettant de diminuer le niveau de stress chez les animaux. L'environnement des animaux est enrichi (miroirs, jouets, balcons, perchoirs, diffusion de musique, ...) et des programmes hebdomadaires d'enrichissement sont établis pour entretenir un intérêt constant des animaux. Le personnel en charge de l'entretien des animaux et des études est formé spécifiquement sur le primate non humain. Ces formations sont régulièrement entretenues.

5538. La transplantation rénale est la meilleure alternative à l'insuffisance rénale terminale. Le nombre croissant de patients en attente de greffe a conduit les équipes de transplantation à élargir les critères de sélection des donneurs, notamment aux donneurs décédés par arrêt cardiaque (DDAC). Selon certaines études, ils seraient susceptibles d'augmenter le pool de donneurs de 20 à 40%. Ces greffons sont néanmoins soumis à une durée d'ischémie chaude suite à l'arrêt circulatoire (no flow) et à la période de réanimation (low flow) et présentent ainsi un risque accru de non fonction primaire et de reprise retardée de fonction. Le reconditionnement des greffons avant prélèvement a donc évolué. Initialement, il se limitait à un refroidissement *in situ* utilisant une sonde de Gillot. Plus récemment, le concept de circulation régionale normo thermique (CRN) s'est développé. Celui-ci fait appel à un circuit extracorporel avec membrane d'oxygénation et à un ballon occlusif positionné dans l'aorte thoracique descendante afin de limiter la recirculation à la région abdominale. En 2000, une équipe barcelonaise a comparé différentes techniques de reconditionnement des organes : sonde de Gillot, circulation extracorporelle hypothermique et CRN. Une meilleure reprise de fonction des greffons avec des survies satisfaisantes à long terme ont été mises en évidence pour le groupe CRN. En

France, le prélèvement de reins chez les DDAC est autorisé depuis 2005. L'Agence de Biomédecine a défini les conditions dans lesquelles ces prélèvements doivent être réalisés, à savoir : - délai entre l'arrêt cardiaque et le début de la réanimation (« no flow ») inférieur à 30 minutes, - durée de réanimation d'au moins 30 minutes (« low flow »), - délai entre l'arrêt cardiaque et le début du refroidissement *in situ* ou de la mise en route de la CRN (délai d'ischémie chaude = « no flow » + « low flow ») inférieur à 150 minutes, - durée de RIS inférieure à 180 minutes ou de CRN inférieure à 240 minutes, - préservation des greffons en machine de perfusion, - durée d'ischémie froide inférieure à 18 heures (à partir de la canulation pour le RIS et à partir de la néphrectomie pour la CRN).

Notre objectif général est de comparer les effets du reconditionnement par CRN 3h versus reconditionnement par sonde de Gillot 3h (résultats déjà obtenus au laboratoire).

Pour mener à bien ce programme de recherche, nous utiliserons un modèle porcin de DDAC avec induction d'un arrêt cardiaque hyperpostassique suivi d'une ischémie chaude de 30min, puis d'un reconditionnement par mise en place d'une CRN pendant 3h. Les reins seront ensuite explantés puis conservés 18h en machine de perfusion hypothermique. A l'issue de cette conservation, chacun des reins sera allogreffé chez un receveur néphrectomisé (de façon bilatérale). Les animaux greffés seront suivis durant 3 mois afin d'analyser la reprise de fonction rénale et les lésions tardives à 3 mois (fibrose). Ce modèle est un modèle maîtrisé au laboratoire et a déjà fait l'objet d'une saisine acceptée par un comité d'éthique. Nous prévoyons de réaliser 6 transplantations (3 donneurs et 6 receveurs). Notre laboratoire possède, depuis plusieurs années, l'expertise et la maîtrise du modèle de DDAC, de la CRN et de l'allo-transplantation chez le porc.

La règle des 3R est prise en compte dans ce projet. Afin d'étudier la séquence de reconditionnement et transplantation d'organe, les méthodes d'étude *in vitro* sont inexistantes en raison de l'absence de vascularisation permanente du rein et de l'impossibilité d'étudier *in vitro* les multiples conséquences de l'ischémie-reperfusion. Il est donc nécessaire d'évaluer les effets du reconditionnement par CRN en utilisant un modèle animal. Le choix porté au modèle porcin repose sur l'utilisation d'un modèle rénal très proche de l'homme et sur notre expertise acquise dans ce modèle (3R : Remplacement). De par notre expertise, ce projet ne nécessite pas de phase de mise au point du modèle. De plus, les groupes contrôles sans CRN et sonde de Gillot 3h ont déjà été réalisés, ce qui réduit le nombre d'animaux de ce projet. Pour ce projet, nous utiliserons un total de 3 animaux donneurs et 6 receveurs, minimum requis pour les analyses statistiques, découlant d'un compromis entre les questions de minimisation d'une part et l'accès à l'information scientifique d'autre part, et établi selon les expérimentations antérieures publiées par le laboratoire (3R : Réduction). Enfin, toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux bénéficieront d'une analgésie per et post-opératoire afin de réduire au minimum la douleur liée à la chirurgie (3R : Raffinement).

5539. L'hyperglycémie peut être le reflet d'un trouble insulinaire chronique (ex. le diabète sucré) ou le reflet d'une exposition à un stress aigu. L'hyperglycémie correspond à un taux anormalement élevé de glucose dans le sang. Au cours des dernières décennies, la prévalence du diabète de type 2 (T2DM) caractérisé par une résistance à l'insuline a rapidement augmenté, et ce, conjointement aux changements observés dans les modes de vie. Actuellement, 382 millions de personnes souffrent de T2DM, et chaque jour, 14 000 personnes en meurent. D'ici à 2035, il est projeté que 592 millions de personnes soient affectées par cette maladie. Le T2DM est, de ce fait, un problème de santé publique majeur et mondial.

L'hyperglycémie est associée à des risques élevés de dysfonctions cérébrovasculaires et rénales, de cancers, de septicémies, de neuropathies et à un risque élevé de mortalité. En outre, l'hyperglycémie est un facteur de risque de l'accident vasculaire cérébral ischémique, et est une valeur prédictive avérée de la gravité des atteintes neurologiques et de la survie du patient.

Il est communément admis que l'hyperglycémie, aiguë ou chronique, sensibilise le cerveau aux agressions endogènes, augmente le stress oxydatif, stimule la production de cytokines pro-inflammatoires et impacte les différents systèmes physiologiques. Similairement, au niveau du système nerveux central, l'hyperglycémie, aiguë ou chronique, perturbe l'homéostasie énergétique, augmente la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, altère l'activité et les fonctions neuronales jusqu'à favoriser le développement de troubles cognitifs et de maladies neurodégénératives.

Le présent projet a pour objectif d'évaluer l'impact de l'hyperglycémie aiguë et répétée et son implication directe dans l'installation d'un désordre métabolique (e.g. T2DM) et de ses complications chez la souris. Actuellement, aucun modèle *in vitro* ne permet d'étudier la complexité des mécanismes d'installation d'un désordre métabolique. La souris est un modèle au plus proche de la réalité physiologique humaine, ce qui en fait un modèle pertinent pour l'étude d'une altération du métabolisme consécutive à des injections de glucose répétées.

Au total, pour ce projet, 40 souris seront utilisées. Des souris C57BL6/J dites sauvages ou « wild type », mâles et femelles, âgées de 10 semaines recevront un traitement de deux injections quotidiennes de glucose sur 6 semaines par voie intrapéritonéale (i.p.). Ces souris seront comparées à un groupe de souris contrôles injectées avec du sérum physiologique selon le même protocole, à un groupe de souris contrôles injectées avec du sérum physiologique selon le même protocole exceptée une injection finale de glucose, à un groupe de souris contrôles injectées avec du mannitol, et à un groupe de souris contrôles injectées avec du sérum physiologique selon le même protocole qui subiront, en sus, une ischémie. Le modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne par mono filament (MCAO) chez la souris mime l'ischémie, induit un accident vasculaire cérébral et permet l'analyse des lésions de reperfusion. Ce modèle est très largement décrit dans la littérature. Les injections seront réalisées quotidiennement à heure fixe, pour garantir une comparaison rigoureuse inter groupes.

Il s'agira alors d'étudier et d'évaluer l'impact et la sévérité du traitement reçu sur la fonction cérébrale, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, le système vasculaire, le stress oxydatif et l'immunité, grâce à des tests comportementaux, biochimiques et immunohistologiques par comparaison aux différents contrôles.

Ce projet de recherche fondamentale répond strictement à la règle des 3R : - l'objectif et les études du projet ne peuvent, en aucune manière, être atteints, sans ces expérimentations chez la souris ; - le nombre de souris est réduit au minimum (40 souris au

total) pour générer des résultats et autoriser une étude statistique fiable ; - les souris seront placées dans des conditions optimales (eau, nourriture, soins, température, hygrométrie, alternance jour/nuite) et seront scrupuleusement observées tout le long de leur traitement (comportement, activité, posture, pelage, respiration).

En cas de souffrance, l'animal sera euthanasié sans délai.

5540. L'amélioration de l'efficacité alimentaire est un enjeu économique et environnemental majeur de la filière porcine, permettant une réduction du coût alimentaire et des rejets par une meilleure utilisation des aliments par les animaux. Depuis 2000 une expérience de sélection en porc a permis d'établir des lignées divergentes pour un critère d'efficacité alimentaire. Ces lignées servent à la fois à la compréhension de l'impact de la sélection pour une plus grande efficacité sur les performances de production et de reproduction des porcs, mais aussi à la compréhension des mécanismes sous-jacents et de leurs impacts sur la robustesse des animaux. Actuellement les deux lignées sont conduites en unité expérimentale sur un site principal (40 truies par lignée) et un site secondaire (16 truies par lignée).

Des aménagements du dispositif expérimental sur le site secondaire sont planifiés en 2017 pour mettre en place un nouvel élevage. Ces évolutions entraînent une modification des installations actuellement disponibles, faisant en particulier disparaître les bâtiments de reproduction conventionnels. Pour sauvegarder les lignées expérimentales dans leur intégralité, il est nécessaire de transférer les ressources génétiques sur le site principal. Ce site, central dans le dispositif d'expérimentation en génétique porcine, est fermé, c'est-à-dire qu'aucune entrée d'animaux n'est autorisée. C'est une stratégie classique de régulation des mouvements dans les élevages de sélection, qui permet de limiter les risques liés à la biosécurité de l'élevage et de préserver les ressources génétiques qui y sont présentes.

L'utilisation de la technique de production d'embryons sur les truies (donneuses) et réimplantation sur des truies receveuses (transfert) a été retenue pour transférer les ressources génétiques des lignées. Elle permettra de maximiser la variabilité génétique récupérée en minimisant les risques biologiques. Cette technique est maîtrisée sur le site, l'expertise est donc disponible sur cette biotechnologie. Pour des raisons anatomiques, à l'inverse des bovins et des équins, chez le porc le transfert des embryons ne peut pas être réalisé par les voies naturelles. Il nécessite une intervention chirurgicale (laparotomie) sur femelles receveuses anesthésiées afin d'extraire une corne et de réimplanter les embryons. Les embryons sont réimplantés dans la journée par voie chirurgicale pour assurer un taux de réussite maximal du transfert.

La règle des 3R est prise en compte dans ce projet :

-Remplacer : le maintien de lignées expérimentales uniques issues de plus de 15 ans de sélection, qui en l'absence de technologie fiable pour la congélation d'embryons chez le porc, ne pourraient pas être conservées autrement et devraient le cas échéant être complètement reproduites si le transfert n'était pas effectué.

-Réduire : la procédure de réimplantation chirurgicale maximise le taux de réussite du transfert; lorsque la génétique de chaque femelle donneuse sera transférée, plus aucun animal ne sera utilisé.

-Raffiner : la douleur est prise en compte par l'injection en intra musculaire d'un anti inflammatoire non stéroïdien pour compléter l'action de l'analgésique pré anesthésie.

Cette demande concerne les 60 femelles présentes sur le site primaire (les femelles receveuses), une seconde demande spécifique aux femelles donneuses hébergées sur un autre établissement utilisateur étant par ailleurs effectuée.

5541. Les personnes accueillies à l'hôpital suite à un traumatisme crânien développent très fréquemment des pneumonies (infections nosocomiales) en raison d'une inflammation initiale des poumons qui favorisent le passage des pathogènes puis l'apparition d'un phénomène d'immunosuppression.

Les cellules épithéliales alvéolaires jouent un rôle immunitaire critique en étant à l'interface entre le monde extérieur et l'organisme. Ces cellules sont capables de détecter la présence de motifs associés aux pathogènes (Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP) et de recruter les cellules de l'immunité telles que macrophages et neutrophiles par la sécrétion de chimiokines (IL-8).

L'interleukine 22 (dite interleukine de l'épithélium) est connue pour jouer un rôle majeur dans la protection ou la réparation des épithéliums notamment pulmonaire. Des travaux du laboratoire ont montré que l'IL-22 joue un rôle majeur lors de pneumonies à *Pseudomonas aeruginosa* et que des cellules épithéliales traitées à l'IL-22 produisent moins d'IL-8 lors de l'infection.

Ce projet a 3 buts et se divise en 3 parties :

- i) Evaluer l'impact du traumatisme crânien sur la physiologie des cellules épithéliales pulmonaires;
- ii) Evaluer le rôle de l'IL-22 dans la protection de l'épithélium pulmonaire suite à un traumatisme crânien;
- iii) Evaluer l'effet thérapeutique de la modulation de l'IL-22 au cours d'infection secondaire suite à un traumatisme crânien;

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons 2648 souris. 1960 souris Swiss mâles et 688 souris C57B/6 mâles seront utilisées.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R. L'étude de l'impact du traumatisme crânien sur la physiologie de cellules épithéliales ne peut s'effectuer que dans un organisme entier. Le nombre de souris a été réduit au minimum possible tout en permettant une analyse statistique fiable. Enfin, le bien-être des souris sera surveillé tout au long de l'étude et la contrainte expérimentale sera prise en charge par des mesures antalgiques appropriées.

5542. L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets de 4 ingrédients riches en protéines et/ou en lipides (développés par un partenaire industriel) et incorporés à deux doses différentes sur la physiologie digestive du porcelet, utilisé comme modèle de l'Homme. Pour cela, neuf aliments ont été formulés sur la base des besoins en énergie et protéines de porcelets de 7 à 10 semaines

d'âges. Ces aliments contiennent un des 4 ingrédients, incorporé à une des deux doses testées. Un neuvième aliment correspondant au régime standard de porcelets de cet âge a été également formulé. Neuf groupes de 8 porcelets *LargeWhite/Landrace/Duroc* âgés de 7 semaines seront constitués. Les porcelets seront logés en cages individuelles. Pendant une première phase d'une semaine d'acclimatation aux nouvelles conditions environnementales, les animaux seront progressivement habitués à recevoir leur ration quotidienne en 3 repas par jour. Ils recevront pendant cette première phase l'aliment standard. Après cette première phase, ils recevront un des 8 aliments expérimentaux ou garderont l'aliment standard. Les animaux seront euthanasiés après 2 semaines de consommation des aliments expérimentaux pour permettre le prélèvement du tractus gastro-intestinal et du sang pour analyses au laboratoire. La croissance, la consommation alimentaire individuelle, l'état de santé sanitaire général, dont la consistance des fèces, seront évalués pendant la période de consommation des ingrédients.

Le présent projet respecte la règle des 3R. En effet, l'impact d'ingrédients alimentaires doit être appréhendé de façon globale sur l'animal (croissance, fonction digestive dans sa totalité) et ne peut pas être évalué par des modèles *in vitro* trop réductionnistes (Remplacement). Le nombre minimum de porcelets à inclure (8 par groupe, soit 72 animaux au total) a été calculé sur la base de la variabilité des paramètres de physiologie digestive évalué dans le projet (Réduction). Enfin, un enrichissement du milieu par la mise à disposition de jouets dans les cages et la possibilité d'interactions visuelles et auditives entre animaux hébergés dans une même salle permettra de réduire le stress lié à l'isolement des animaux en cages individuelles (Raffinement).

5543. Certaines études expérimentales chez le porc, comme l'étude de pathogènes spécifiques, le contrôle de vaccins ou la production de sérums ou d'organes doivent être réalisées sur des animaux exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS), afin que d'éventuelles autres contaminations ne viennent pas modifier les symptômes ou les réactions immunitaires des animaux. Ces porcs EOPS peuvent naître par voie naturelle d'une truie elle-même indemne de pathogènes spécifiés ou par césarienne. Dans ce deuxième cas, la césarienne doit être réalisée dans des conditions les plus aseptiques possibles. Les porcelets issus de cette opération sont ensuite transférés, également dans des conditions aseptiques, dans un élevage confiné dont tous les intrants sont contrôlés afin de réduire le risque de contamination externe : air filtré, alimentation thermisée (lait irradié aux rayons gamma, aliment chauffé à une température de 85°C afin de détruire certains germes potentiellement pathogènes), matériel désinfecté, douche pour le personnel, etc. L'asepsie lors de la césarienne est obtenue en réalisant la césarienne sur un utérus isolé par hystérectomie et ouvert dans un isolateur à atmosphère filtrée. L'objectif de ce projet est d'optimiser l'inconscience de la truie qui subit l'hystérectomie tout en préservant le réveil des porcelets. En effet, peu de données sont disponibles sur l'anesthésie de la truie pour la réalisation de césarienne tout en garantissant un bon réveil des porcelets. Pour cela plusieurs protocoles d'anesthésie seront expérimentés. Nous avons tenu compte de la règle des 3R, c'est-à-dire Remplacement : La truie étant la cible directe de ces essais, le recours à l'expérimentation animale est indispensable et le remplacement n'est pas possible. Réduction : ce projet sera réalisé sur un maximum de dix truies et leurs 15 porcelets en moyenne, soit 160 animaux, nombre qui a été réduit au minimum, pour prendre en compte une variabilité individuelle de réaction à l'anesthésie ; Raffinement : le but premier de cet essai est d'éviter toute souffrance aux truies lors de l'opération, de plus les truies et porcelets seront surveillés en continu au cours de l'opération.

5544. Dans un contexte de durabilité de l'alimentation des animaux, l'utilisation et la valorisation de sources de protéines non conventionnelles et locales doivent être encouragées. Il est important de disposer de références permettant d'évaluer chez l'animal la qualité nutritionnelle de ces sources protéiques. Une des étapes passe par l'évaluation de la biodisponibilité des acides aminés de ces sources en protéines ainsi que leur pouvoir insulino-gène qui conditionnera l'anabolisme protéique et l'efficacité alimentaire. Dans ce projet, la source de protéine testée est issue de l'hydrolyse de plumes de volailles pour fournir un hydrolysate de protéines très riche en acides aminés et hautement digestible. Ce produit est utilisé principalement en alimentation des carnivores domestiques (chien, chat) mais est mal caractérisé sur le plan de la biodisponibilité en acides aminés.

Le présent projet a pour objectif de déterminer la biodisponibilité des acides aminés de la source de protéine mentionnée ci-dessus en la comparant à d'autres sources de protéines mieux connues de façon à identifier ses propriétés nutritionnelles par rapport à des références connues. La biodisponibilité des acides aminés sera déterminée en analysant la vitesse d'apparition dans le sang circulant des acides aminés issus de la digestion et de l'absorption d'un repas d'épreuve (repas de petite taille destiné à être mangé rapidement par les animaux). Le projet sera réalisé sur 6 porcs miniatures adultes munis d'un cathéter jugulaire, posé par voie chirurgicale et sous anesthésie générale, permettant de réaliser sans douleur et stress pour l'animal des prélèvements sanguins fréquents et répétés permettant de suivre l'apparition dans le sang des acides aminés du repas (Raffinement). La durée de l'essai sera de 5 semaines au total incluant la pose du cathéter et la phase de récupération/adaptation (2 semaines) suivies de 3 semaines de repas d'épreuve. Six sources de protéines seront testées (incluant l'hydrolysate de plumes) successivement sur chaque porc sous forme de repas d'épreuve. Ceci consiste à proposer au porc un aliment dont la seule source de protéine sera la source de protéine testée et de réaliser une fois ce repas pris une cinétique de prélèvements de sang pendant 6 heures après le repas (environ 20 prélèvements de 4 ml de sang) à raison de 2 repas d'épreuve par semaine pour chaque porc (6 repas d'épreuve au total). Le sang prélevé permettra ensuite le dosage des acides aminés, du glucose et de l'insuline.

Le porc miniature est utilisé dans ce projet comme espèce modèle pour pouvoir travailler sur un animal adulte de taille raisonnable par rapport à un porc conventionnel. L'utilisation d'animaux vivants dans ce projet ne peut être remplacée par des approches cellulaires dans la mesure où il s'agit de mesurer la biodisponibilité de nutriments après ingestion d'un repas et que la biodisponibilité résulte de nombreux processus biologiques comme l'ingestion, la digestion et les régulations métaboliques qui ne peuvent être reproduites par des modèles cellulaires (Remplacement). Dans ce projet, chaque porc est son propre témoin car il se verra proposé successivement les 6 sources de protéines. Ce dispositif dit en carré latin permet de gérer la variabilité entre animaux en travaillant sur un effectif limité d'animaux (Réduction). Le projet sera réalisé sur 6 porcs miniatures adultes munis

d'un cathéter jugulaire, posé par voie chirurgicale et sous anesthésie générale, permettant de réaliser sans douleur et stress pour l'animal habitué à la présence de l'homme des prélèvements sanguins fréquents et répétés par des personnes qualifiées afin de suivre l'apparition dans le sang des acides aminés du repas (Raffinement).

5545. Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 15 ans pour les sarcomes d'Ewing et 18 ans pour les ostéosarcomes, les deux tumeurs osseuses primitives les plus fréquentes). Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de poly-chimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » : les cellules tumorales induisent la production (directe ou indirecte *via* les cellules stromales ou les ostéoblastes) de facteurs activateurs des ostéoclastes (tels que RANKL, TNF, IL-6, PTH-rP...) qui vont induire la différenciation et l'activation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader l'os. Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle va permettre la libération de facteurs de croissance stockés dans cette matrice qui vont à leur tour activer la prolifération des cellules tumorales. L'hypothèse thérapeutique développée dans le laboratoire est de bloquer ce cercle vicieux entre prolifération tumorale / résorption osseuse en ciblant à la fois les cellules tumorales et les cellules osseuses.

Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives par l'utilisation de molécules, antisense, miRNA à activité anti-tumorale et/ou anti-résorption osseuse en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées *in vivo* dans des modèles murins xénogéniques d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro*, et l'éventuelle application clinique. Elles sont incontournables avant une application clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par condition, à raison de 4 conditions par molécule à tester, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Nous évaluons à 6 le nombre de molécules anti-résorption et 6 les molécules anti-tumorales, soit 12 molécules au total sur une période de 5 ans. Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées) et en bi-thérapie. Chacune des expérimentations sera confirmée une fois. Si les résultats sont homogènes nous ne renouvelerons pas inutilement l'expérimentation selon la règle des 3R. Néanmoins, si les résultats des 2 expérimentations sont hétérogènes ou discordantes, nous renouvelerons l'expérimentation (pour un total de 3).

Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening *in vitro*. Un total de 2304 souris immuno-déficientes est prévue sur une période de 5 ans.

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

5546. Les patients paralysés présentent de nombreuses complications qui impactent leur récupération ou leur qualité de vie. Parmi elles les para-ostéoarthropathies, correspondant à du tissu osseux qui apparaît en zone où normalement il ne se développe pas (notamment autour des articulations) et entraîne douleurs, limitations d'autonomie et retenti sur la récupération neurologique. Les limitations fonctionnelles (raideurs articulaires) et les compressions des nerfs et des vaisseaux créés par ces ossifications ont donc une conséquence majeure chez ces patients déjà en situation de handicap lourd. L'impact en phase précoce après le traumatisme, période stratégique de la récupération neurologique, est non négligeable : ralentissement des processus de réparation et du programme de rééducation, rallongement de la durée d'hospitalisation et induction de chirurgies complexes pour cette population très fragile.

Depuis leur description pendant la première guerre mondiale, aucun traitement médical qui puisse permettre de pallier à cette complication n'a été efficace. La seule thérapeutique est l'excision chirurgicale. Ce traitement tardif et palliatif expose à de nombreux risques anesthésiques, opératoires et péri-opératoires pour ces populations fragiles parfois complètement momifiées par ces gangues osseuses. Le surcoût de prise en charge est non négligeable puisqu'une majoration de coût global a été évaluée à un montant de 25k€ par chirurgie en sachant que la moitié des patients touchés développent au moins deux localisations.

Une des raisons de cet échec de prise en charge s'explique par le fait que cette complication est perçue tardivement et ne se développe pas chez tous les patients. Il est donc impossible de déterminer les critères précoces qui induisent cette transformation de tissu. Depuis cent ans, de nombreuses équipes ont tenté de comprendre le mécanisme voire de tester des traitements de cette complication sur ces populations, sans succès malheureusement.

Notre projet de recherche consiste à :

1. développer le premier modèle animal créant ce type d'ossification sur des souris.
2. disséquer les mécanismes
3. tester des traitements préventifs sur ces souris
4. valider des traitements préventifs chez l'homme grâce à notre rattachement à une unité médicale spécialisée en charge spécifiquement de ce type de complication chez des patients.

La section médullaire annule la perception de la douleur en post chirurgie. Les constats actuels (travail de 18 mois à l'étranger) n'ont pas mis en évidence de douleurs liées à une éventuelle repousse axonale, ni mis en évidence de détresse des animaux sujets du projet. Notre projet expérimental envisage d'utiliser 168 animaux sur 10 mois. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (6 souris par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées.

Le modèle animal est construit pour qu'une souris ne développe ces ossifications qu'en un seul site : un muscle de patte arrière, le membre controlatéral servant de témoin (réduction). De plus l'animal sera rendu paraplégique par section chirurgicale de la moelle épinière en T11-T12 selon des procédures chirurgicales et de suivi postopératoire validés et associées à une surveillance clinique rapprochée (deux observations par animal et par jour, 7j/7) (raffinement).

5547. L'obstruction urétérale unilatérale (OUU) est un modèle expérimental couramment utilisé pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les lésions rénales responsables de la progression vers l'insuffisance rénale chronique. Ce modèle permet également des études pharmacologiques précliniques visant à tester de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir, freiner, voire stopper, l'insuffisance rénale chronique.

Le contexte dans lequel se place ce modèle est celui de la maladie rénale chronique. Comme le montre la dernière étude, l'incidence et la prévalence de la maladie rénale chronique (MRC) ne cesse d'augmenter de par le monde. La MRC est, parmi les maladies non transmissibles entraînant une cause de décès prématuré, celle qui a le plus augmentée entre les années 1990-2013. L'évolution lente, progressive et inéluctable vers l'insuffisance rénale terminale (IRT) fait que la MRC devient un problème socio-économique majeur. L'IRT se caractérise par l'accumulation progressive de fibrose c'est à dire l'accumulation des protéines de la matrice extracellulaire (principalement des collagènes) dans l'interstitium rénal. A ce jour seul les inhibiteurs de l'enzyme de conversion semblent ralentir la progression de cette fibrose et il n'existe toujours pas de molécules antifibrosantes. Plusieurs molécules d'origine végétale provenant de la biodiversité de l'île de La Réunion ont été isolées et des études montrant les propriétés anti oxydantes et anti inflammatoires de ces molécules (polyphénols) ont été publiées. A notre connaissance aucune étude n'a été effectuée pour étudier le potentiel anti-fibrosant de ces molécules au niveau rénal.

Grâce au modèle d'obstruction unilatérale urétérale, qui est un modèle de développement accéléré de fibrose rénale, nous évaluerons à la fois les extraits polyphénoliques provenant d'*Antirhea borbonica*, *Doratoxylon apetalum* et *Gouania mauritiana* ainsi que trois de leurs composés actifs (acide caféique, acide chlorogénique, kaempferol) qui se retrouvent en proportions différentes dans chaque extrait.

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

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

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

Nous utiliserons un maximum de 390 souris C57BL/6.

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

5548. La cardiopathie diabétique est une complication sévère de l'obésité et du diabète de type 2, qu'aucun modèle *in vitro* ne peut mimer. Nous avons identifié une protéine QSOX1 qui a un rôle protecteur au niveau cardiaque face à un stress aigu. Comme QSOX1 semble impliqué dans la résistance à l'insuline, nous faisons l'hypothèse que la surexpression de QSOX1 aura un rôle bénéfique dans le développement de la cardiopathie diabétique et tout particulièrement au niveau des cellules contractiles, alors que l'absence de QSOX1 sera délétère.

Notre objectif est de définir le rôle de QSOX1 dans la survenue de la cardiopathie diabétique en utilisant des souris sauvages et génétiquement modifiées pour le gène QSOX1 (absence d'expression ou surexpression de façon totale dès la conception et dans toutes les cellules, ou de façon induite au sevrage et spécifiquement dans un des types cellulaires du cœur). Les souris seront soumises à un régime riche en sucre et graisse pour induire le diabète de type 2. Les animaux pourront être soumis à une hypertension artérielle dépendante de l'angiotensine 2, afin de mimer au plus près les situations cliniques humaines. L'ensemble du projet représente un total de 640 animaux au maximum. Le modèle souris, qui permet d'explorer ces syndromes complexes, ne peut être remplacé par des modèles de culture cellulaire ou mathématiques. Les contrôles, sans diabète ni hypertension servent aux 2 protocoles, de même que les contrôles de tous les groupes souris QSOX1 "conditionnelles" permettent de réduire de façon importante le nombre d'animaux. Le raffinement des protocoles est obtenu par un enrichissement du milieu de stabulation et des protocoles d'exploration non sanglants permettant un suivi longitudinal au cours de l'étude, l'entraînement des animaux aux

procédures permet de diminuer le stress, les protocoles raffinés et validés d'anesthésie et analgésie sont utilisés pour la pose des mini pompes et l'échocardiographie. Pour valider notre hypothèse, nous analyserons le cœur par échocardiographie et rechercherons les modifications de la structure et du profil protéique cardiaques.

Résultats espérés en termes de santé publique :

Si QSOX1 apparaît protéger le myocarde face à un stress métabolique chronique tel que le diabète, nous pourrions envisager des stratégies visant à stimuler l'expression de cette protéine.

5549. Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 18 ans pour les ostéosarcomes). Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de poly-chimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » : les cellules tumorales induisent la production (directe ou indirecte *via* les cellules stromales ou les ostéoblastes) de facteurs activateurs des ostéoclastes (tels que RANKL, TNF, IL-6, PTH-rP...) qui vont induire la différenciation et l'activation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader l'os. Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle va permettre la libération de facteurs de croissance stockés dans cette matrice qui à leur tour vont activer la prolifération des cellules tumorales. L'hypothèse thérapeutique développée dans le laboratoire est de bloquer ce cercle vicieux entre prolifération tumorale / résorption osseuse en ciblant à la fois les cellules tumorales et les cellules osseuses.

Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives par l'utilisation de molécules, antisense, miRNA à activité anti-tumorale et/ou anti-résorption osseuse en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées *in vivo* dans des modèles murins syngéniques d'ostéosarcome.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro* et l'éventuelle application clinique, et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par condition, à raison de 4 conditions par molécule testée, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Les expérimentations seront répétées 1 à 2 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés. Un total de 10 molécules seront étudiées sur une période de 5 ans, 5 pour une stratégie anti-résorption osseuse et 5 en anti-tumoral. Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées), et en bithérapie.

Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening *in vitro*. Un total d'environ 1920 souris immunocompétentes est prévu sur une période de 5 ans.

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 quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis (.

5550. Les récents succès de l'immunothérapie inaugurent un changement de paradigme en oncologie où la thérapie est conçue pour cibler non seulement les cellules cancéreuses, mais aussi le système immunitaire. Les tumeurs malignes pédiatriques diffèrent de leurs homologues adultes à la fois d'un point de vue histologique et génomique. Le contexte immunitaire est probablement lui aussi différent. Les évaluations précliniques sont des étapes cruciales dans le développement de nouvelles thérapies chez des patients cancéreux. Cependant, les limites actuelles des modèles précliniques, principalement basée sur l'utilisation de xéno greffes humaines immunodéprimées ou des modèles murins syngéniques, sont plus évidentes en ce qui concerne les explorations d'immunothérapie. Par conséquent, notre projet vise à développer et caractériser des modèles présentant un système immunitaire « humanisé » et porteurs de tumeurs malignes pédiatriques de haut risque, dans le but d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant l'immunothérapie seule ou en combinaison dans les cancers de l'enfant et de l'adolescent.

Pour ce projet, nous procéderons en trois étapes:

- 1) caractérisation de la reconstitution du système immunitaire à partir de cellules souches hématopoïétiques pédiatriques,
- 2) caractérisation du développement tumoral et de l'infiltration immunitaire dans les souris humanisées,
- 3) caractérisation du développement tumoral et de l'infiltration du système immunitaire dans un modèle de greffe autologue (même donneur tumeur - cellules souches).

Actuellement, il nous est impossible de remplacer la souris pour explorer l'infiltration du système immunitaire dans nos tumeurs *in vitro*, cependant tous les moyens seront mis en œuvre pour améliorer le bien-être des animaux pendant l'étude. Pour ce projet, chaque étape sera analysée statistiquement avec un test non paramétrique de Mann-Whitney (n=2 groupes) ou Kruskal-Wallis (n> 2 groupes). Le nombre d'animaux a été réduit au nombre suffisant pour obtenir un résultat significatif. Nous utiliserons 230 souris pour ce projet au maximum.

Toutes les injections seront réalisées après application d'un anesthésique local, les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux recevront un analgésique post-opératoire. Les souris seront hébergées en groupe et l'environnement sera enrichi avec du cocoon. Chaque étape devra être validée et significative pour passer à la suivante. Un échec lors d'une étape entraînera l'arrêt du protocole.

5551. La translocation bactérienne constitue une complication majeure chez les patients bénéficiant de fortes doses de chimiothérapies. Elle est à l'origine notamment d'infections bactériennes graves pouvant mettre en danger le pronostic vital. Dans le cadre de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, elle peut être à l'origine d'une complication dysimmunitaire majeure que constitue la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD). Sa physiopathologie est due à l'atteinte des cellules intestinales par la chimiothérapie qui favorise le passage de produits microbiens dans le sang, responsables de l'activation des cellules immunitaires du donneur. Ces cellules activées reconnaissent les tissus du patient comme étrangers qui vont les détruire, à l'origine de la gravité de la GvHD. L'ensemble de l'intestin est tapissé de mucus qui est une barrière protectrice. Le renforcement de la barrière de mucus par délivrance hétérologue de domaines des mucines gélifiantes ou le renforcement de la barrière intestinale par des pharmaco-nutriments limiterait le passage de produits microbiens ou/et micro-organismes et la survenue d'une GvHD. Notre projet vise à proposer une nouvelle approche en renforçant l'effet « barrière » de l'intestin afin de limiter le développement et la sévérité de la GvHD.

Remplacement : L'étude de l'influence de l'atteinte intestinale lors d'une chimiothérapie ou avant la greffe et l'effet bénéfique du renforcement de celle-ci sur la survenue et la sévérité de la GvHD ne peuvent être menés que dans un modèle physiopathologique intégré.

Réduction et Raffinement : Ce projet nécessitera 12 souris pour mettre en place un modèle de gavage par une souche bactérienne non pathogène sur un modèle de souris possédant un mucus renforcé ou des souris traitées par pharmaco-nutriments. L'ensemble du projet nécessitera 618 souris. Les souris seront hébergées dans une animalerie exempte de tout organisme pathogène et auront une surveillance quotidienne à partir du début des protocoles. Toute souris montrant un signe de souffrance ou ayant une perte de masse corporelle > 20 % par rapport à la masse initiale sera immédiatement euthanasiée par injection létale de 100 microlitres en intrapéritonéale de pentobarbital à 50 mg/ml.

5552. La schizophrénie et l'épisode dépressif majeur (EDM) sont des maladies psychiatriques qui constituent un problème de santé publique important. Ces maladies sont essentiellement traitées par les neuroleptiques pour la schizophrénie et par les antidépresseurs pour l'EDM. Cependant, certains patients sont résistants à ces traitements (30% par exemple des patients atteints d'EDM ne répondent pas aux antidépresseurs) et ces molécules présentent des effets secondaires importants d'où la nécessité de développer de nouvelles molécules thérapeutiques. De récentes études montrent que la schizophrénie est associée avec des altérations synaptiques impliquant le cytosquelette. Ce projet est basé sur l'utilisation d'un modèle souris validé pour l'étude de pathologies psychiatriques de types schizoïdes. Ces souris présentent des défauts synaptiques, de neurogenèse adulte, de connectivité et de comportement.

L'atout principal de ce projet, est de pouvoir corrélérer des effets comportementaux à des modifications biologiques. Ce projet devrait ainsi permettre

- 1) de tester l'intérêt thérapeutique de nouvelles molécules pour le traitement de troubles psychiatriques en utilisant le modèle murin d'intérêt ;
- 2) de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets thérapeutiques observés avec ces nouvelles molécules ou avec des traitements déjà utilisés.
- 3) de caractériser les domaines fonctionnels responsables de ces défauts de neurogenèse, de connectivité neuronale et synaptique.

La découverte de nouvelles thérapies efficaces devrait permettre d'une part d'apporter une réponse aux patients résistants aux traitements en cours, et d'autre part, de pouvoir diminuer les effets secondaires de certaines thérapies actuellement couramment utilisées.

L'intérêt de ce projet étant la corrélation entre le comportement des animaux suite à l'administration du traitement et les effets biologiques sous-jacents, il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Cependant, la toxicité de toutes les molécules a été testée sur des neurones en culture.

Ce projet est composé de 6 procédures expérimentales et nécessitera l'utilisation de 1280 souris. Ce nombre d'animaux a été déterminé grâce, à des tests statistiques et grâce aux expériences déjà réalisées sur ce modèle animal (nombreuses publications), ce qui nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

L'administration prolongée des traitements permet de pouvoir surveiller et évaluer régulièrement la santé des animaux, et ce à l'aide d'une grille codifiant le niveau de douleur. Ceci permettant d'intervenir de manière appropriée en cas de souffrance de l'animal.

5553. L'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) est une tumeur très agressive et métastatique. Les patients sont traités par chirurgie et chimiothérapie mais les traitements ne sont pas efficaces, le PDAC présentant un taux de survie à 5 ans très faible. Les PDAC sont caractérisés par un défaut de distribution des médicaments dans la tumeur. Nous avons développé et breveté une famille de peptides capables d'inhiber la protéine nucléoline et de bloquer la croissance des tumeurs PDAC. Nous voulons, dans ce projet, tester l'importance de la présence de la protéine nucléoline dans la croissance des tumeurs pancréatiques et étudier la fonction de la nucléoline dans ces tumeurs. Nous prévoyons de greffer de deux façons différentes, deux types de cellules tumorales sur des souris exprimant ou non la nucléoline et de mesurer l'efficacité de notre traitement dans ces différentes conditions.

Les expériences de ces projets sont menées sur des souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer la protéine nucléoline au niveau tissulaire et ne peuvent pas être menées *in vitro* hors contexte tissulaire. Cependant, nous menons en parallèle des études

pour essayer de répondre à certaines questions avec des modèles cellulaires *in vitro* et remplacer les modèles animaux. Ce projet prévoit d'utiliser 416 souris. Dans ce projet nous avons pris toutes les mesures nécessaires pour respecter la règle des 3R de l'expérimentation animal. Nous avons réduit le nombre des animaux grâce à l'expérience acquise sur le modèle animal utilisé et des informations obtenues avec des expériences menées *in vitro*. Nous avons raffiné les techniques pour respecter le bien-être animal et la prise en charge de la souffrance.

5554. *Mycobacterium abscessus* est une bactérie responsable d'infections chroniques pulmonaires chez des patients immunodéprimés ou immunocompétents présentant un terrain particulier, comme par exemple, les patients atteints de mucoviscidose. Chez ces derniers elle contribue de façon significative au déclin de la fonction respiratoire. Les lésions prennent la forme de bronchectasies qui peuvent entraîner des abcès pulmonaires nécessitant un traitement chirurgical. Le traitement des infections à *M. abscessus* repose sur la prise d'un antibiotique de la famille des macrolides, généralement la clarithromycine, associé à un ou plusieurs autres antibactériens dont la nature varie en fonction du profil et de la résistance de l'espèce isolée. Cette antibiothérapie donne des résultats variables et souvent temporaires du fait de la résistance de la bactérie à la plupart des antibiotiques actuels. Cette résistance s'explique par la présence d'une enveloppe imperméable, la production de systèmes d'export et l'acquisition de mécanismes de résistance. La lutte contre les infections liées à *M. abscessus* nécessite une meilleure connaissance des facteurs bactériens impliqués dans la pathogénie et la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Notre objectif est d'apporter de nouvelles informations sur les facteurs impliqués dans la virulence de *M. abscessus* et d'étudier comment ils interviennent dans l'interaction hôte/pathogène. Nous cherchons plus particulièrement à étudier le rôle joué par différents composés de l'enveloppe de la bactérie lors de l'interaction hôte/pathogène, en comparant la vitesse de multiplication et le taux de persistance de souches sauvages et mutantes de *M. abscessus* produisant ou non ces composés dans une souche de souris immunodéficientes (SCID), la bactérie étant rapidement éliminée dans des souris immunocompétentes de type BALB/c. Nous souhaitons également rechercher parmi une population de mutants générés aléatoirement, ceux qui ont perdu la capacité à se multiplier ou à persister dans la souris pour mettre en évidence de nouvelles voies métaboliques impliquées dans la pathogénie. Les résultats attendus devraient apporter des connaissances sur les mécanismes de la pathogénie en révélant l'importance de certains composés pour la multiplication et la survie de la bactérie chez l'hôte.

Les animaux infectés dans cette étude sont utilisés pour déterminer des paramètres de virulence des souches (survie, charges bactériennes). Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 858 souris SCID.

Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 3 étapes dans notre raisonnement.

- 1) Dans la mesure du possible, toutes les expériences réalisées sur les souris font suite à des étapes de validation dans des modèles cellulaires : ainsi les expériences proposées sont réalisées au stade où les méthodes de remplacement de l'expérimentation animale ont été exploitées et où les résultats s'avèrent suffisamment prometteurs pour utiliser le modèle intégré murin.
- 2) Les différentes phases du projet (clairement identifiées dans la procédure détaillée) seront suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des résultats.
- 3) Nos expériences antérieures nous ont fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs. La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : i) lors de l'anesthésie et de l'infection des animaux, ii) lors de l'inflammation pulmonaire chronique et des dommages tissulaires induits par l'infection. Ces deux niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans la procédure et déjà appliquée dans nos projets antérieurs.

5555. L'étude de la transmission d'agents pathogènes (virus) par des moustiques nécessite le maintien en élevage, au sein d'insectariums, de nombreuses populations de moustiques du stade œuf jusqu'au stade adulte sur plusieurs générations. Les femelles de moustiques, après accouplement avec les mâles (fécondation), doivent se nourrir de sang pour pouvoir assurer la maturation de leurs œufs. Le sang leur apporte des substances nutritives indispensables à la ponte. Dans la nature, les sources de sang sont des vertébrés (oiseaux, mammifères ou humains) avec lesquels les moustiques cohabitent. Au sein du laboratoire, les sources de sang les plus biologiquement pertinentes sont les souris ou les lapins de laboratoire. Dans le présent projet visant à maintenir des populations de moustiques sains en élevage, les souris de laboratoire ont été identifiées comme des sources régulières de sang.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'utilisation d'autres sources de sang (poche de sang, globules rouges lyophilisés) ne permet pas la production d'œufs de qualité et en quantité acceptable. L'attractivité d'un vertébré vivant et l'absorption de sang frais sont les conditions optimales pour le maintien en élevage des moustiques et les plus proches des conditions naturelles de vie de ces insectes. 480 souris seront utilisées sur 5 ans. Ce nombre que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience concernant l'étude des moustiques, sur le fait que nous entretenons cinq espèces différentes (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes vexans*, *Culex pipiens*, *Culex molestus*) originaires de plusieurs continents (Europe, Afrique, Amérique et Asie).

Ce projet occasionnera quelques effets néfastes pour les animaux. La piqure par les femelles moustiques engendre une légère réaction immunitaire due au contact de la salive injectée par l'insecte au moment de la prise de sang. Il n'y a pas de démangeaison cutanée constatée ; la souris ne tente pas de se gratter la face ventrale de son corps qui est la partie exposée aux piqures des moustiques. L'anémie due au prélèvement du sang est prise en compte en limitant le temps de contact avec les femelles moustiques ; chaque lot de souris n'est exposé qu'une fois par semaine avec un temps de contact de 30 minutes maximum et ceci, 3 fois sur un mois

Afin de limiter le nombre d'animaux, toutes les populations ne sont pas mises en élevage en même temps. Les œufs de certaines espèces peuvent se conserver plusieurs mois à sec, une caractéristique qui nous permet de décaler les dates d'éclosions et réduire

ainsi le nombre de femelles moustiques à nourrir au même moment. Les souris seront anesthésiées avant d'être mises au contact des moustiques et n'y resteront pas plus de 30 minutes afin que leur réveil n'intervienne pas avant le retour dans leur cage. Les souris sont surveillées au réveil pour vérifier leur état de santé. Selon un planning précis, chaque lot de six souris, sera mis au contact des moustiques un jour/semaine et 3 fois/mois. Une pesée hebdomadaire des animaux, au moment du change des cages, sera effectuée pour détecter une éventuelle perte de poids. Tout animal montrant des signes de souffrance sera euthanasié. Le bénéfice attendu du projet est la production d'œufs de moustiques ayant une bonne qualité d'éclosion et en quantité suffisante pour entretenir les populations de moustiques indispensables aux travaux du laboratoire portant principalement sur le virus de la Dengue, du Zika et du Chikungunya.

5556. Le cœur est parcouru par une activation électrique se propageant dans les cellules afin qu'elles se contractent de façon concertée pour permettre la circulation sanguine. Le dysfonctionnement de cette activation électrique, qui peut être causé par exemple par une maladie coronarienne, ou une défaillance cardiaque en conséquence à une crise cardiaque passée, et est associé à un grand nombre de facteurs de risque (tabagisme, diabète, obésité), peut avoir des conséquences dramatiques. En particulier la présence d'arythmies peut multiplier par 5 le risque d'accident cardio-vasculaire. Il est par conséquent crucial de pouvoir détecter et visualiser ces anomalies, afin de correctement diagnostiquer les patients, et mieux comprendre l'activation électrique cardiaque. La mesure de l'activation cardiaque est déjà possible de façon non-invasive avec les Electrocardiogrammes (ECG). Cependant l'ECG ne donne accès qu'à l'activation électrique globale qui permet l'évaluation du rythme cardiaque. Cela permet de détecter des anomalies comme l'arythmie, mais la mise en évidence localement de la cause ou de la région affectée n'est pas accessible. L'imagerie par acousto-électrique se base sur l'utilisation d'ondes ultrasonores émises localement dans les tissus. Cela permet de localiser avec précision l'activation électrique, avec pour but ultime de la cartographier mais aussi de repérer les régions anormales. La technique a déjà été validée et étudiée à l'aide de simulations et de montages expérimentaux reproduisant l'activation électrique *in-vivo*. En effet, l'impossibilité de simuler un système vivant complexe comme le système cardiaque nous contraint à valider la méthode sur des animaux, ce qui constitue une étape cruciale en vue d'une potentielle application clinique. Dans un premier temps, ce projet vise donc plus particulièrement à établir la faisabilité de la technique pour l'observation de flux électriques cardiaques *in-vivo*.

Ceci implique l'accès à un modèle de cœur animal de taille suffisante dont la complexité soit suffisamment proche du système humain, mais qui permette une procédure expérimentale simple, ce qui est le cas du cœur de rat.

Nous avons développé un processus expérimental qui nous permettra d'appliquer trois procédures au même animal, afin de limiter au minimum le nombre d'animaux utilisés. Le projet prévoit au minimum 10 et au maximum 60 rats nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant suffisant pour permettre l'interprétation des résultats. Enfin, le bien-être des animaux sera assuré tout au long de leur manipulation, depuis les conditions d'hébergement jusqu'à la minimisation de la douleur lors des procédures expérimentales. A leur arrivée les animaux subiront environ 5 jours d'acclimatation pour s'adapter à leur nouvel environnement. Les animaux seront hébergés en groupe dans des cages équipées dans un environnement approprié et enrichi.

Ces expérimentations nous permettront de conclure sur la faisabilité de la méthode pour l'étude de cœurs vivants, ainsi que de perfectionner la technique pour optimiser les résultats. Ceci est une étape incontournable en vue d'une application clinique qui pourrait avoir un très grand impact sur le diagnostic et le traitement de patients atteints de troubles de l'activation cardiaque.

5557. L'asthme est une maladie chronique inflammatoire qui aboutit à l'obstruction bronchique.

Elle est multifactorielle et les facteurs déclenchant sont nombreux (pollens, infections, tabac...).

Selon l'Institut de Veille Sanitaire, l'asthme touche environ 10 % des enfants et plus de 5 % des adultes.

Entre 2010 et 2012, en moyenne 908 décès par an en France métropolitaine et plus de 60 000 séjours hospitaliers enregistrés en 2014. Pour la médecine régénérative, la thérapie cellulaire et les cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentent des caractéristiques prometteuses. Comme par exemple leur potentiel de différenciation ou leur action anti-inflammatoire.

De plus, les CSM sont facilement accessibles et amplifiables en laboratoire en grande quantité, ce qui accroît leur intérêt pour des stratégies thérapeutiques. Injectées par voie systémique, les CSM peuvent migrer vers la lésion à traiter et y moduler la sécrétion de diverses cytokines aidant à réduire l'inflammation, ceci associé à une capacité de réparation intrinsèque par différenciation cellulaire. Cependant, les CSM ont une propension à mourir lorsqu'elles sont implantées dans un environnement hostile limitant leur potentiel régénérateur.

Notre équipe en collaboration avec une start-up spécialisée dans la thérapie cellulaire a montré qu'associer ces cellules à un biomatériau (que l'on appellera ultérieurement NB) apporte une valeur ajoutée au devenir des CSM.

Ces biomatériaux dégradables, présentant une surface de matrice extracellulaire avec des molécules d'adhésion, permettent de créer une structure tridimensionnelle adéquate pour l'attachement et la différenciation des cellules greffées, ceci améliorant le pouvoir d'adhésion des cellules ainsi que leur survie.

Après avoir développé et caractérisé le modèle de lésion pulmonaire chez le rat, l'objectif du projet est de démontrer la faisabilité de l'administration des NB par voie systémique, l'innocuité et l'efficacité thérapeutique de ce traitement combinant les CSM et le NB dans ce modèle.

Le modèle que nous souhaitons utiliser s'appuie sur des études antérieures publiées dans la littérature. Ces données expérimentales constitueront la première étude chez le rongeur combinant les CSM au NB, thérapie réparatrice qui pourrait être à terme d'un intérêt dans la pathologie pulmonaire.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale, mais se conforme à la réglementation en vigueur dans le respect de la réduction du nombre d'animaux. Par ailleurs, toutes les interventions seront réalisées sous anesthésie adéquate complétée par un traitement analgésique si cela s'avère nécessaire. L'ensemble du projet sur 5 ans est divisé en 2 procédures et nécessitera l'utilisation de 242 rats.

5558. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la production des cellules sanguines est importante pour différentes problématiques de santé publique. Les cellules sanguines sont produites tout au long de la vie d'un individu de façon continue afin d'assurer leur renouvellement. Ces cellules sont produites à partir de cellules souches sanguines qui sont initialement produites au cours de la vie embryonnaire avant de s'implanter dans la moelle osseuse, siège de l'hématopoïèse adulte.

Dans certaines situations pathologiques (maladies infectieuses, maladies inflammatoires ou encore traumatismes) ou suite à des traitements thérapeutiques (chimiothérapies, radiothérapies), le besoin accru de cellules sanguines nécessite une stimulation des cellules souches sanguines afin de répondre à cette demande. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de recherche. En effet, mieux comprendre comment les cellules souches sanguines sont générées et comment elles sont stimulées par différents stress sanguins permettra de développer de nouveaux protocoles thérapeutiques ou d'optimiser ceux existants.

Il se déclinera en deux axes de recherche et sera mené en utilisant la souris comme modèle d'étude:

- Etudier les mécanismes de génération des premières cellules souches sanguines au cours du développement embryonnaire de la souris. Etant donné que les cellules souches sanguines représentent une option thérapeutique largement utilisée à la fois dans les pathologies sanguines mais aussi dans différentes pathologies cancéreuses, mieux comprendre leur génération permettra de les étudier préalablement à leur transplantation.

- Comprendre les mécanismes d'activation des cellules souches sanguines en conditions de stress. Les résultats de ces travaux permettront d'optimiser les traitements chez l'Homme en stimulant ces processus chez les patients.

Pour ces études, le modèle de choix est la souris. En effet, aucun modèle cellulaire *in vitro* ne permet de mener les études proposées puisque ces mécanismes impliquent des micro- et macro-environnements cellulaires, incluant de nombreux types cellulaires. Dans les différentes expérimentations, une attention particulière sera portée sur la douleur des souris afin d'y remédier. La détermination sexuelle n'étant pas importante pour les études envisagées, les souris des 2 sexes seront utilisées. Ces études nécessitent l'utilisation de 290 souris / an, soit 1450 souris pour l'ensemble du projet.

Ce projet est composé de 2 procédures expérimentales, la mise en œuvre générale du projet sera assurée sous la responsabilité d'une personne. Chaque procédure expérimentale a fait l'objet d'études préliminaires *ex vivo*, permettant d'optimiser au mieux le nombre d'individus utilisés, ainsi que le bien-être animal, pour les études *in vivo* envisagées.

La procédure expérimentale «Émergence des cellules souches hématopoïétiques et hématopoïèse embryonnaire » vise à déterminer le rôle d'un régulateur de l'émergence des premières cellules souches hématopoïétiques et des cellules hématopoïétiques chez les embryons de souris. Cette procédure génère un degré de sévérité minimal (classe légère). Elle nécessite l'utilisation de: 130 souris / an. L'accouplement sera contrôlé physiquement (observation du plug vaginal à 0,5dpc). Cette procédure nécessite la création par croisement, d'une nouvelle lignée murine. Pour se faire, il faudra importer la lignée de souris Tg (Cdh5-cre) 1Spe/J. Ce modèle permet d'invalider le régulateur étudié dans les premières cellules souches hématopoïétiques définitives de la souris émergeant au niveau de l'AGM (Aorte-Gonades-Mesonephros) à 10,5 dpc.

Cette procédure permettra d'une part de déterminer la viabilité des souris d'intérêt et d'étudier le phénotype des embryons. Les propriétés des cellules souches hématopoïétiques des embryons et de leur progénie seront étudiées en utilisant les techniques biologiques classiques (cytométrie en flux et techniques histologiques).

La procédure expérimentale «Hématopoïèse de stress » vise à étudier l'impact de l'absence d'un régulateur sur l'hématopoïèse d'urgence. Cette procédure génère le degré de sévérité de classe modérée. Cette procédure utilisera la lignée murine actuellement utilisée dans un projet antérieur dans l'établissement utilisateur. Cette procédure nécessite l'utilisation de: 160 souris / an.

L'ensemble des actes expérimentaux seront assortis de moyens antalgiques appropriés.

Nous étudierons l'impact de l'absence de ce régulateur sur les cellules hématopoïétiques suite à différents traitements induisant des stress hématopoïétiques (traitement par des composés mimant une infection, par des cytokines inflammatoires, par des composés utilisés en chimiothérapie, irradiation) en utilisant les modèles décrits précédemment par analyse des paramètres hématologiques et par les techniques biologiques classiques.

5559. La dengue est une infection virale transmise par la piqûre d'un moustique. Les symptômes se manifestent 3 à 14 jours après la piqûre infectante. On observe alors un syndrome grippal touchant les nourrissons, les jeunes enfants et les adultes. Il n'existe aucun traitement spécifique. Cette absence de traitement ne serait pas un problème si ces symptômes grippaux n'évoluaient pas parfois vers une forme de dengue hémorragique potentiellement mortelle. On retrouve plus de 70% de la charge de morbidité imputable à cette maladie en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental. En Amérique latine et dans les Caraïbes, en Afrique et dans la Méditerranée orientale, l'incidence comme la gravité de la maladie ont augmenté ces dernières années. Trois milliards et demi de personnes risquent maintenant d'être infectées dans le monde. On distingue quatre sérotypes du virus de la dengue (DENV1, DENV2, DENV3, et DENV4).

Les primates non humains sont à ce jour les seuls animaux sur lesquels il est possible de tester des vaccins et des médicaments contre la dengue. Les isolats cliniques du virus de la dengue ne causent pas de maladie chez les souris de laboratoire classiques. Le développement d'un modèle murin approprié de la dengue est donc un enjeu important.

Nous avons pour projet d'infecter expérimentalement de nouvelles lignées de souris avec le virus de la dengue afin d'identifier des lignées sensibles qui développeraient des symptômes comparables à ceux observés dans les populations humaines. Ce projet nécessite d'infecter des souris par voie intraveineuse. Le degré de sévérité attendu étant inconnu, les individus infectés pourront ne développer aucun symptôme ou développer une dengue hémorragique et mourir. Nous utiliserons des groupes de dix animaux de façon à limiter la variation entre les expériences, ce qui permettra de réduire également le nombre des animaux témoins. Le nombre estimé d'animaux nécessaires au projet est comparable à ceux qui peuvent être relevés dans la littérature pour des études similaires. Il correspond au nombre nécessaire à la validation statistique de l'objectif fixé mais il pourra être affiné en cours de réalisation du projet. Par exemple, il diminuera pratiquement de moitié, si le sexe de l'animal s'avère ne pas avoir d'influence sur l'issue d'une infection par le virus de la dengue.

Ce projet se traduira pour une durée de 5 ans par l'utilisation de 2180 souris (1090 mâles et 1090 femelles).

Les souris infectées seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Elles seront maintenues dans un environnement protégé tout au long de l'infection. Les animaux seront évalués cliniquement tous les jours, deux fois par jour, durant toute la durée de l'infection.

Les animaux qui présenteraient des signes avérés de détresse avant la fin de l'expérimentation seront euthanasiés. Ces signes de détresse seront évalués grâce à la grille de suivi de la douleur, du stress et de l'inconfort que recommande le comité d'éthique. Les souris qui ne présenteront pas de signes cliniques seront euthanasiées 21 jours après le jour de l'infection.

5560. De très nombreuses études montrent que le niveau de consommation des protéines animales des pays les plus riches ne pourra pas se généraliser à l'échelle planétaire en l'état actuel des ressources. Dans ce contexte, le maintien de la part des protéines dans l'alimentation nécessite de développer de nouveaux régimes et pratiques alimentaires qui viseront à augmenter la part relative des produits végétaux. L'évaluation de la qualité des protéines issues de ressources alternatives est une étape essentielle lors du développement d'ingrédients protéiques à haute valeur ajoutée.

Plusieurs critères rendent compte de la qualité protéique. Parmi eux, le coefficient d'efficacité protéique (CEP) et le score chimique corrigé de la digestibilité (PD-CAAS).

Le CEP consiste à évaluer chez le rat en croissance la capacité d'une protéine à couvrir les besoins pendant la croissance. D'un point de vue pratique, des rats en croissance sont nourris pendant un mois avec un régime contenant l'ingrédient à tester. Le CEP est le gain de croissance observé sur un mois divisé par la consommation cumulée de protéines sur cette même période.

Le PD-CAAS, officiellement recommandé par la FAO (« Food and Agriculture Organization »), est basé sur l'analyse de la composition en acides aminés indispensables de la protéine pour évaluer sa capacité à satisfaire les besoins nutritionnels. Ce score chimique est corrigé de la digestibilité, mesurée souvent au niveau fécal chez le rat.

Le rat est un bon modèle pour étudier la digestibilité des protéines car son alimentation et son système digestif sont proches de ceux de l'Homme. De plus il n'existe aucun modèle *in vitro* pour mesurer ces paramètres, ce qui nous permettra de tester des protéines d'intérêt avant des études chez l'Homme. Pour les deux critères nous utiliserons 8 animaux par protéine ce qui est le nombre minimal d'animaux pour avoir une bonne représentation statistique. Pendant les cinq ans que se déroulera le projet nous envisageons de tester une dizaine de protéines issues de diverses sources (levure, végétales, fractions de protéines de lait...) sur les deux critères ce qui implique un nombre important d'animaux (800) répartis de la façon suivante : 8 animaux par lot et par protéine étudiée, 10 protéines testées par an soit 80 animaux pour le CEP et 80 animaux pour PD-CAAS soit au total 160 animaux / an donc 800 rats au total sur 5 ans. Ces protocoles ne nécessitant pas d'euthanasier les animaux et ils pourront être adoptés par une association agréée de défense animale avec laquelle nous avons un contrat.

Les animaux sont hébergés dans des cages individuelles en plexiglass, nous enrichissons le milieu avec des tunnels en cartons et des anneaux.

Ces études nous permettront de tester de nouvelles sources de protéines potentiellement utilisables pour répondre à la demande croissante en protéines au niveau mondial.

5561. Les cellules tumorales dialoguent avec le milieu qui les entoure, appelé microenvironnement tumoral. Parmi les composants cellulaires de ce microenvironnement, le rôle des adipocytes a longtemps été ignoré. Pourtant, ces cellules se trouvent à proximité de différents types de tumeurs, y compris le mélanome invasif, notre modèle d'étude. Les adipocytes sont le composant majoritaire du tissu adipeux et sont spécialisés dans le stockage de la graisse. Mon équipe a montré que les adipocytes favorisent l'agressivité tumorale, et ce de façon amplifiée en obésité, ce qui pourrait expliquer le pronostic défavorable observé chez ce sous-type de patients.

Nous étudions un mode de communication original entre adipocytes et cellules tumorales, médié par les exosomes. Les exosomes sont des petites vésicules capables de transporter des molécules d'une cellule à une autre. Ils sont sécrétés par les adipocytes, favorisant un comportement agressif des cellules tumorales exposées à ces vésicules. Dans un contexte d'obésité, les exosomes sécrétés par les adipocytes ont un effet majoré sur l'agressivité tumorale. Nos résultats, réalisés en modèle cellulaire, montrent que l'effet des exosomes adipocytaires dépend d'un remodelage de leur métabolisme en faveur de l'utilisation d'acides gras pour produire de l'énergie. Ces acides gras sont mobilisés par les cellules tumorales par autophagie pour produire de l'énergie au sein des mitochondries, organites décrits comme « usine énergétique » des cellules. L'activité augmentée des mitochondries conduit à une fragmentation de ces organites, un processus clé responsable de l'agressivité tumorale observée en présence des exosomes adipocytaires.

Nos travaux dans un modèle murin auront donc pour but d'étudier le rôle des exosomes adipocytaires, et l'implication des différents processus décrits ci-dessus, dans la progression du mélanome (effet sur tumeur primaire et la formation de métastases).

Pour cela des cellules tumorales d'origine murine seront injectées au niveau du site primaire du mélanome cutané (injection intradermique). Ces cellules auront été préalablement traitées ou non avec des exosomes adipocytaires de sujets normopondéraux ou obèses et invalidés ou non pour des protéines clés impliquées dans les processus induits par les exosomes adipocytaires (métabolisme des acides gras, autophagie et fission mitochondriale).

Afin de limiter la souffrance des animaux, ces derniers seront observés quotidiennement pendant la durée des expérimentations et, en cas de souffrance, ils seront traités par analgésiques ou euthanasiés si nécessaire.

L'ensemble du projet nécessitera au maximum 184 souris mâles, en comptant les mises au point des protocoles.

5562. Actuellement, la nécessité de trouver de nouvelles approches afin de combattre les infections s'impose. Plus spécifiquement les infections (opportunistes ou non) chez les patients immunodéprimés et âgés sont en recrudescence en raison de l'acquisition par ces bactéries de mécanismes de multi résistance aux antibiotiques. Cela est particulièrement vrai pour les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (plus de 30% des patients infectés ont des souches antibiorésistantes) et *Burkholderia cenocepacia*. De même, l'infection pulmonaire par seulement 10 bactéries *Francisella tularensis* se traduit par la mort des patients si non traités à temps. Enfin, *Mycobacterium tuberculosis* constitue un problème de santé publique en raison des difficultés à éliminer ce pathogène par les traitements actuels. Communs à toutes ces bactéries susmentionnées, est leur voie d'infection: le poumon. Ainsi, afin de comprendre et d'étudier les aspects par lesquels ces pathogènes altèrent la réponse immunitaire et la physiologie de l'hôte, nous souhaitons développer un modèle murin d'infection pulmonaire aux bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis spp novicida* et *Mycobacterium tuberculosis* dans des souris C57BL/6 sauvages et génétiquement invalidées (déjà présentes au laboratoire) pour des gènes de la réponse antibactérienne. L'ensemble de ces gènes est commun à l'Homme et la souris. L'utilisation de modèles génétiquement invalidés pour des effecteurs de la réponse immune nous permet d'isoler les cibles essentielles quant à l'élimination des bactéries pathogènes par l'organisme mais également de pouvoir à terme moduler la réponse antibactérienne de manière appropriée. Afin de s'assurer du respect des 3R, l'ensemble de ces expérimentations s'appuie sur des modèles d'infections maîtrisés et publiés par le laboratoire et des équipes externes permettant d'optimiser le nombre d'animaux. De plus, les animaux utilisés sont élevés dans des conditions permettant un bien être essentiel (sociabilité des animaux, portoirs ventilés, enrichissement...). Enfin, les traitements expérimentaux sur les animaux se basent sur des méthodes ayant pour but d'occasionner un minimum de stress et de douleur à l'animal. Ainsi, l'ensemble de ces outils expérimentaux nous permettrons d'établir chez ces souris (2052 animaux totaux sur une durée de 5 ans), l'importance de ces effecteurs conservés chez l'Homme et dont l'absence ou la mutation sont associés à différentes déficiences en réponse à différentes infections bactériennes.

5563. L'épilepsie est un trouble neurologique grave caractérisé par des crises spontanées et récurrentes. Cette maladie affecte près de 1% de la population mondiale, ce qui représente pour la seule union européenne un coût clinique annuel de 15,5 milliards d'euros. Environ 30% des patients épileptiques ne répondent pas aux médicaments antiépileptiques disponibles et la neurochirurgie résective représente pour eux le dernier recours. De nombreuses données indiquent que les altérations cérébrovasculaires jouent un rôle clef dans la physiopathologie de l'épilepsie expérimentale et clinique. Récemment, une approche cérébrovasculaire de l'épilepsie a apporté plusieurs informations sur la façon dont des dysfonctionnements vasculaires et de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique impactent négativement l'activité neuronale. Notre projet de recherche vise à élucider la dynamique et les interactions entre chaque partenaire cellulaire de la micro vascularisation cérébrale dans le cerveau épileptique pour améliorer notre compréhension de la physiopathologie des épilepsies focales et leur diagnostic clinique. Dans ce projet, nous utiliserons deux modèles d'épilepsie : un modèle d'épilepsie mésiotemporale chez la souris et un modèle non-lésionnel d'épilepsie absence chez le rat. Chaque modèle animal reproduit de nombreuses caractéristiques de la forme d'épilepsie correspondante chez l'homme (similitude avec la pathologie humaine aussi bien sur le plan histologique, électro physiologique, comportemental que pharmacologique) et l'emploi de deux modèles animaux différents permettra d'évaluer la généralité des altérations vasculaires à travers les formes d'épilepsie. Nous proposons un programme de travail centré sur l'imagerie cérébrovasculaire multimodale, avec et sans thérapie. Lors des différentes étapes du protocole, les animaux seront manipulés et surveillés minutieusement par des expérimentateurs habilités et compétents. Ce projet respecte la règle des 3R.

- Nous avons effectué une recherche approfondie sur Pubmed et Google Scholar afin de nous assurer de l'inexistence d'approches alternatives *in vitro* qui pourraient être utilisées pour reproduire l'interaction entre malformations du développement corticale, crises épileptiques et fonction de la barrière hémato-encéphalique. Nous avons utilisé des combinaisons de mots-clés tels qu'épilepsie, crise, électroencéphalographie, dysplasie, cerveau, neurone, modèles animaux, *in vitro* et tests animaux alternatifs. Cette recherche n'a pas identifié de solution *in vitro* alternative pour notre étude. En effet les méthodes *in vitro* basées sur la culture cellulaire ne présentent pas les systèmes de communication multicellulaires nécessaire pour ce projet.

- Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet sera de 504, réparti en 24 groupes de 18 souris et 6 groupes de 12 rats. Nous avons réduit le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle. Afin de réduire le plus possible toute douleur ou détresse que les animaux pourraient ressentir, ils seront observés au moins une fois par jour par le personnel compétent impliqué dans la réalisation des procédures expérimentales et/ou dans l'application de ces procédures et/ou dans les soins aux animaux. Les animaux seront également hébergés dans des conditions répondant aux critères relatifs aux soins et à l'hébergement des animaux de l'Annexe II du 1er février 2013 de l'arrêté fixant les conditions d'agrément, limitant ainsi les angoisses qui pourraient être induites par l'environnement.

- Nous vérifierons aussi que les tissus des animaux soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales. Le choix de l'imagerie *in vivo* (suivi longitudinal) permet notamment d'atteindre cet objectif.

5564. Actuellement, 70 à 90% des patients traités avec un agent immuno-modulateur (AIM) ne répondent pas, du fait d'une quasi-absence de réponse immunitaire anti-tumorale avant traitement. La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers, consistant à utiliser des rayonnements ionisants (dit aussi "rayons" ou "radiations") pour détruire les cellules cancéreuses. Actuellement, plus de 50% des patients atteints d'un cancer sont traités par radiothérapie. Des études précliniques indiquent que la radiothérapie pourrait initier une réponse immunitaire anti-tumorale et des essais cliniques sont en cours pour évaluer le bénéfice d'une combinaison « radiothérapie + agent immuno-modulateur ».

Dans ce projet, nous évaluerons l'efficacité anti-tumorale de nanoparticules en combinaison avec la radiothérapie et un agent immuno-modulateur dont l'efficacité et le mode d'action sont connus et publiés. Les propriétés physiques de ces nanoparticules (NPs) inertes permettent d'augmenter la dose de radiothérapie délivrée à l'intérieur de la tumeur, sans augmenter les dommages aux tissus sains. La combinaison nanoparticules + radiothérapie a démontré à de nombreuses reprises *in vitro* et *in vivo*, une efficacité accrue comparée à la radiothérapie seule.

L'objectif de ce projet est de démontrer un bénéfice de la combinaison « nanoparticules + radiothérapie + agent immuno-modulateur » au niveau de la réponse anti-tumorale par rapport au traitement « radiothérapie + agent immuno-modulateur » seul.

Les données précliniques sur la combinaison de ces traitements n'existent pas. Il est donc indispensable pour évaluer ces combinaisons d'utiliser un modèle animal, en l'occurrence la souris immunocompétente, seul capable de reproduire à la fois la complexité du développement tumoral et la réponse immunitaire. Nos études préliminaires sur cellules en culture, les données précliniques de nos études précédentes avec les nanoparticules en combinaison avec la radiothérapie et les renseignements fournis par la littérature nous ont permis de réduire au maximum le nombre d'animaux requis pour cette étude en termes de choix des doses de traitement, schéma et délais d'injections et de ne choisir que les conditions optimales à évaluer. L'expérience acquise et une expertise statistique rigoureuse nous a permis de limiter le nombre d'animaux à utiliser dans cette étude au strict nécessaire, tout en permettant une évaluation rigoureuse du traitement. Les animaux seront hébergés dans le respect des conditions en vigueur et toutes les dispositions nécessaires seront prises afin d'éviter l'angoisse et la souffrance que pourraient occasionner les traitements (suivi clinique quotidien, anesthésie gazeuse en cas de procédure douloureuse ou stressante, administration d'antidouleurs en préventif et en curatif pour les procédures pouvant induire douleurs, angoisse ou inconfort).

Pour ce projet, 896 souris Balb/C au maximum pourront être nécessaires afin de répondre aux objectifs de ce projet.

5565. Nous organisons annuellement un enseignement de niveau international consacré à la biologie des cellules souches. En réalisant les gestes intrinsèques à tout projet de recherche, les participants sont amenés à appréhender les difficultés, les subtilités et à acquérir les bases des gestes adéquats pour leurs expériences futures. L'étude des cellules souches est en expansion et la compréhension de leurs propriétés exige de recourir aux animaux de laboratoire en tant que modèles expérimentaux : les souris sont le modèle de choix chez les mammifères. Cet enseignement comporte des travaux pratiques sur les technologies de pointe dans le domaine des cellules souches qui impose le recours à l'utilisation des animaux de laboratoire, principalement comme donneurs de cellules ou pour produire des embryons.

Nous estimons à 160 souris/an (mâles et femelles de 4 à 8 semaines) l'effectif qui sera intégré dans 2 procédures expérimentales de classe légère et sans réveil, comportant essentiellement des injections de substances non toxiques sans impact sur le bien-être des animaux. Les procédures présentées ci-dessous ne peuvent être atteintes par d'autres techniques de remplacement *in vitro* et requièrent le recours à des animaux de laboratoire. Les effectifs ont été réduits au maximum tout en permettant d'atteindre les objectifs pédagogiques de l'enseignement et des mesures de raffinement telles que l'administration d'un mélange sédatif anesthésiant seront opérées.

5566. La division cellulaire est un processus ordonné et très régulé. Chaque cellule qui entre en division duplique d'abord ses chromosomes (ou ADN), puis les ségrège rigoureusement dans deux cellules filles identiques lors d'un processus vital appelé mitose. Une prolifération cellulaire incontrôlée peut conduire à la formation de tumeurs ou potentialiser la progression tumorale. Notre équipe a identifié une nouvelle voie de signalisation essentielle pour la prolifération cellulaire. Cette voie est composée de la protéine kinase Greatwall (Gwl) et ses deux cibles, les protéines cAMP regulated phosphoprotein 19 (Arpp19) et Endosulfon alpha (ENSA). A ce jour, aucune donnée n'existe dans la littérature scientifique quant au rôle de Arpp19 ou ENSA, dans les divisions cellulaires des tissus sains ou cancéreux *in vivo*. Des résultats de notre laboratoire suggèrent que ces deux substrats pourraient participer au contrôle de différentes phases du cycle cellulaire. Notamment, nos données suggèrent un rôle de Arpp19 dans le contrôle de la division mitotique alors que ENSA pourrait intervenir dans la régulation de la réplication de l'ADN. Nous avons récemment démarré un projet visant l'étude du rôle de Arpp19 dans la prolifération *in vivo*. Le but de ce nouveau projet est d'étudier la fonction de l'autre substrat, ENSA. Pour cela, nous initierons un projet identique à celui développé pour Arpp19. Nous utiliserons une souris transgénique où le gène cible (ENSA) est excisé de façon inductible et ubiquitaire ou dans des tissus sélectionnés, pendant l'embryogenèse ou dans l'animal adulte. Le nombre de souris prévu à utiliser est de 314.

Le principe des 3R sera respecté :

Remplacement : la seule procédure existante pour une analyse *in vivo* du rôle physiologique d'une protéine est l'utilisation d'une souris transgénique où le gène cible est excisé, le remplacement de cette approche est donc impossible.

Réduction : le nombre de souris prévues pour ce projet a été analysé pour chaque procédure et réduit au maximum.

Raffinement: les animaux seront observés quotidiennement et les signes de souffrance (perte de poids, hyperactivité ou au contraire isolement, hérissément des poils, dos voûté) seront recherchés. Les animaux démontrant 20% de perte du poids initial, seront sortis du protocole. En cas de signe de douleur la souris sera isolée et traitée avec un antalgique (buprénorphine).

0.05mg/Kg). Si les souris manifestent des signes de stress, de la nourriture gélifiée sera placée dans la cage pour faciliter la réhydratation. Les souris seront hébergées à raison de 5 par cage afin de limiter le stress et l'angoisse. Leur environnement sera enrichi par un mélange de copeaux et sciure. Un fond sonore musical sera maintenu dans les pièces de stabulation afin de limiter les variations de bruit. Enfin, les animaliers s'occupent toujours des mêmes souris qui sont changées selon un planning hebdomadaire strict afin d'éviter de les stresser.

Dans tous les cas, dès qu'un animal atteindra un des points limites, il sera euthanasié par une méthode règlementaire.

Lors de l'induction des tumeurs coliques, le traitement chimique sera arrêté dès le premier infléchissement de la courbe de poids et des premiers symptômes de colite par mesure du degré de diarrhée engendrée par le traitement. Cette approche permet aux animaux de bénéficier d'une récupération complète ce qui n'est pas le cas lorsque la décision d'arrêter le traitement est prise, ne serait-ce qu'un jour plus tard.

5567. Les expériences menées au sein de l'Etablissement s'inscrivent dans le cadre de la formation universitaire de nos étudiants. Ces expériences correspondent à une demande issue du Programme Pédagogique National (PPN) établi par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche en 2013.

Dans le cadre de ce programme, il y a une nécessité d'enseignements pratiques en physiologie. Cela implique d'apprendre le fonctionnement physiologique des organismes vivants par une approche théorique. Tout cela dans le cadre d'une maîtrise des techniques de bases d'observation, d'analyse et d'expérimentation, spécifiques aux organismes vivants. Il s'agit dans le premier cas d'étudier les grandes fonctions physiologiques et leur régulation (digestion, respiration, circulation, excrétion...) et dans le second cas de maîtriser des techniques expérimentales en physiologie animale sur animaux entiers *in vivo* ou organes isolés ou *in vitro* afin d'étudier ces grandes fonctions.

De plus, une refonte des options du DUT Génie Biologique est à envisager. Dans ces conditions, notre formation devra être davantage orientée sur la physiologie animale et notamment sur un approfondissement des règles relatives à l'expérimentation animale et aux bonnes pratiques de laboratoire, notamment dans le cadre d'études toxicologiques ou pharmacologiques. Cela dans un but de former nos étudiants dans la quantification d'une activité pharmacologique et/ou toxicologique (études du mode d'action et de la relation effet/dose).

Les travaux pratiques de physiologie animale sont réalisés uniquement sur des rats (Wistar ou Sprague Dawley) préalablement anesthésiés par l'enseignant. Espèces privilégiées dans le cadre d'études pharmacologiques et/ou toxicologiques. Les TP réalisés impliquent la pause de cathéter sur les jugulaires afin de réaliser des injections intraveineuses. L'utilisation d'animaux plus petits (souris) ne serait pas appropriée dans le cadre de cette formation pour une première expérience sur l'animal vivant anesthésié.

L'utilisation de lapins (aussi très utilisés en pharmacologie) pourrait être envisagée mais cela impliquerait de revoir notre structure d'accueil, l'animalerie étant trop petite pour accueillir des animaux de « grande taille ». Sinon, il faudrait alors envisager un travail en groupe (1 lapin pour 6 étudiants) ce qui enlèverait tout l'intérêt d'un TP si tous les étudiants ne peuvent plus pratiquer.

Des mesures sont prises en compte pour respecter la règle des 3R.

Remplacement : Pour atteindre les objectifs présentés ci-dessus (mise en application d'un module d'enseignement sur les maîtrises des techniques expérimentales utilisées en physiologie animale), il est nécessaire d'avoir recours à des animaux : il n'y a pas de méthode substitutive pour répondre à la question posée. Un nombre conséquent de nos étudiants se destinent à être techniciens de laboratoire et la connaissance de leurs limites vis à vis d'une appréhension éventuelle à travailler sur l'animal vivant est indispensable. Et dans ces conditions, il n'y a pas de méthode alternative.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum. La promotion compte 52 étudiants, divisée en 4 groupes TP. Nous réalisons 3 procédures expérimentales par étudiant par an. Sachant que les étudiants travaillent par binôme et trinôme, ceci nous amène à l'utilisation de 72 animaux par an (24 rats * 3 séances). Ce projet étant demandé pour une durée de 5 ans, soit 5 promotions, cela revient à l'utilisation de 360 animaux.

Nous avons limité le nombre d'animaux en ne réalisant pas de TP individuels. Cependant, diminuer encore le nombre d'animaux (1 rat pour 4 étudiants...) nuirait à la notion de travaux « pratiques ». Si le nombre d'étudiant diminue en cours d'année et devient inférieur à 12 dans un groupe TP, alors nous revoyons à la baisse le nombre d'animal utilisé (le nombre d'animaux commandés est ajusté 1 semaine avant la séance). De même, si un animal venait à mourir lors de la séance, nous nous sommes interdits à le remplacer, l'étudiant se joint à un autre groupe, en aucun cas un nouveau rat sera anesthésié.

Raffinement : Les travaux pratiques sont réalisés sur des rats préalablement anesthésiés par l'enseignant. Une injection d'analgésique est réalisée en tout début de séance. Les TP réalisés impliquent la pause de cathéter sur les jugulaires afin de réaliser des injections intraveineuses ainsi que des prélèvements de sang.

Une évaluation de la réaction à la douleur est réalisée sur toute la durée de la manipulation sur la zone interdigitale, ainsi qu'un contrôle des fréquences ventilatoires et de la couleur des muqueuses. Si nécessaire, d'après l'évaluation par l'enseignant responsable, une nouvelle injection d'anesthésique est renouvelée pendant la séance. Chaque séance consiste en une manipulation en aigu intégralement sous anesthésie générale au terme de laquelle l'animal ne reprend pas conscience. Les méthodes de mise à mort choisies sont conformes à l'annexe 4 de la directive 2010/63. L'euthanasie est pratiquée sur l'animal toujours anesthésié (procédure classée « sans réveil ») par injection létale d'anesthésique par voie intraveineuse. La mort est évaluée par un contrôle de l'arrêt des mouvements respiratoires sur un temps suffisamment long.

5568. Le contrôle de l'expression des gènes (transcription) est très important pour la mise en place des différents types cellulaires de l'organisme. Nous nous intéressons à la transcription au cours de la croissance des ovocytes. Cette transcription est particulière car elle met en œuvre une machinerie unique qui permet la croissance de l'ovocyte (augmentation du diamètre de 10-20 à 80-90

micromètres). Ce projet a pour but d'étudier l'étape d'initiation de la transcription. Les techniques classiques d'analyse des ARN messagers ne sont pas assez précises pour étudier cette étape d'initiation: le but de ce projet est d'utiliser une technique de marquage des ARN nouvellement transcrits dans une lignée de souris génétiquement modifiée. Ce projet a avant tout un intérêt fondamental cependant il est connu qu'un défaut de la croissance ovocytaire est une cause de stérilité chez la femme: la compréhension des mécanismes fondamentaux de la croissance ovocytaire est indispensable pour espérer comprendre et traiter les causes de stérilité chez les femmes.

Remplacement: Nous utilisons un modèle animal parce qu'il n'existe pas encore de système cellulaire efficace et équivalent *in vitro*. Nous utilisons la souris parce que cette technique nécessite une lignée génétiquement modifiée qui exprime de manière conditionnelle une enzyme permettant de marquer les ARN.

Réduction: Nous avons développé la technique de marquage et d'analyse de ces ARN dans des systèmes cellulaires, ce qui nous permet d'optimiser le nombre d'animaux. Ce projet nécessite 400 souris femelles (2x100 contrôles et 2x100 mutantes). Ce nombre est important parce qu'il est nécessaire de récupérer une quantité suffisante d'ARN et que nous réaliserons l'expérience en dupliqué.

Raffinement: Cette technique se limite à une injection d'une molécule non toxique. Elle n'est pas douloureuse et est très limitée dans le temps puisque les animaux sont euthanasiés au maximum 4 heures après l'injection afin de récupérer les ovaires: le suivi des animaux sera donc assuré pendant cette période. Cette technique ne nécessite pas non plus d'isoler les animaux et permet de maintenir l'environnement social des animaux.

5569. Les données existantes sur les productions avicoles sont basées majoritairement sur le modèle d'élevage standard en claustration. Cependant, les systèmes alternatifs comme le label rouge et la production biologique, sont en augmentation et représentent environ le 1/3 de la production. Ces systèmes ont pour caractéristiques notamment l'utilisation de type génétique à croissance lente (âge abattage de 81 jours minimum en système alternatif vs 35 jours en standard pour un poids identique) et l'accès à un parcours extérieur. L'acquisition de références sur leur alimentation est indispensable pour en améliorer la durabilité. Les 2 principaux facteurs de l'alimentation pour lesquels il n'existe pas à ce jour de référence sont : les matières premières spécifiques liées au cahier des charges et l'impact du parcours comme source de nutriment d'une part ou comme diluant de la ration alimentaire d'autre part. Par exemple, les matières premières utilisées en production biologique n'ont pas forcément les mêmes caractéristiques que les matières premières conventionnelles. De plus, les animaux consomment la végétation disponible sur les parcours extérieurs, mais il existe très peu de données sur la quantité, le type de plante ingérée et l'impact de cette consommation.

L'objectif de ce projet est de disposer de méthodes fines pour : 1) évaluer la valeur nutritionnelle de matières premières biologiques riches en protéines sur un modèle d'animaux en croissance lente, via des bilans digestifs 2) évaluer les contributions potentielles des plantes présentes sur les parcours extérieurs qui sont consommées par les volailles.

Ce projet utilisera 240 poulets de chair au total. 120 animaux seront utilisés pour les bilans digestifs puis 120 autres animaux pour la validation de méthode de quantité de végétaux ingérés.

Le remplacement n'est pas possible car il n'existe à ce jour aucune technique *in vitro* suffisamment précise pour apprécier la valeur nutritionnelle des aliments par espèce. La réduction est prise en compte avec un nombre d'animaux limité au minimum statistique requis. Le raffinement consiste à réaliser plusieurs prélèvements et mesures sur un même lot d'animaux, à réduire le temps de séjour en cages des animaux (5 jours d'adaptation et 3 jours de bilan), en travaillant sur des régimes alimentaires aussi équilibrés que possible pour éviter les dérèglements digestifs, en réalisant les bilans dans des cages grillagées sur les 4 côtés permettant le plus possible aux animaux de se voir et d'échanger.

5570. La très grande majorité des porcs subissent une caudectomie (coupe de la queue) dans les jours qui suivent la naissance pour éviter des problèmes de caudophagie (cannibalisme de queue) pendant la période de post-sevrage et surtout d'engraissement. Cette caudectomie réduit fortement le risque de caudophagie mais ne l'élimine pas. La coupe de queue est source de douleur. La caudophagie est aussi source de douleur et de stress pour les animaux et, de perte économique pour les éleveurs. Pouvoir prédire les épisodes de cannibalisme permettrait de réduire leur gravité, voire de les éviter complètement. Ces épisodes sont associés à des modifications anormales de l'activité comportementale, en particulier de l'agitation, qui pourraient servir de prédicteurs. Cependant ces modifications sont difficilement détectables par les éleveurs. Disposer d'un système automatique de détection de ces modifications permettrait d'avancer considérablement dans cette problématique et donc d'améliorer le bien-être des porcs. Le projet correspond à la phase préliminaire d'un projet plus vaste qui vise à mettre au point un système automatique de détection des problèmes comportementaux. Des tests de fiabilité et de robustesse du système électronique sont nécessaires et font l'objet de ce travail expérimental. Le projet prend en compte la règle éthique des 3R. Il est nécessaire de travailler sur des porcs vivants puisqu'il s'agit de mettre au point une méthode automatique de suivi de leur comportement. Nous travaillerons sur 16 porcs en engraissement dont 5 seront porteurs du système électronique. Ces animaux auront subi les interventions habituellement pratiquées en élevage de porcs (réduction de la longueur de la queue et castration des mâles) mais cela ne posera aucun problème pour cette phase préliminaire du projet qui vise à vérifier la capacité des capteurs de mouvements à identifier des épisodes d'agitation comportementale et non le cannibalisme de queue sensu stricto. Le nombre d'animaux est justifié car travailler sur deux groupes est un minimum pour observer le maximum de situations représentatives de la vie des porcs. Par ailleurs, les deux loges comporteront 8 porcs afin de travailler sur des groupes de taille suffisante pour que les relations sociales soient proches de celles rencontrées dans les élevages commerciaux. Les procédures appliquées aux animaux (pose d'une bague à l'oreille, regroupement d'animaux non familiers) sont fréquentes dans les élevages commerciaux et sont de classe légère. Les animaux seront observés

pour détecter d'éventuels problèmes et seront traités en conséquence de façon à limiter au maximum les souffrances potentiellement éprouvées par les porcs.

5571. Le diabète de type 2 est une pathologie dont l'incidence est en constante augmentation dans le monde et dont la mortalité est associée en premier lieu à des complications cardiovasculaires. Les maladies cardiovasculaires et leurs facteurs de risques sont associés précocement à un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire. Cette monocouche cellulaire située sur la face interne de l'ensemble des vaisseaux sanguins joue un rôle central dans le maintien d'un état vasculaire optimal. La dysfonction endothéliale associée au diabète va favoriser le développement des facteurs de risques cardiovasculaires pouvant à terme aboutir à des événements adverses tels que l'infarctus du myocarde ou l'AVC. De plus, des études récentes suggèrent que l'induction d'une sénescence endothéliale pourrait contribuer à l'initiation et au développement de la dysfonction endothéliale liée au diabète.

Le contrôle strict de la glycémie par les traitements thérapeutiques classiques ne semble pas être associé de façon convaincante à une diminution de la mortalité et de la morbidité cardiovasculaires. Toutefois, une récente étude clinique a montré qu'un nouveau traitement antidiabétique pouvait diminuer le risque d'un premier événement cardiovasculaire chez des patients atteints d'un diabète de type 2 avec un haut risque cardiovasculaire. Cet effet bénéfique pourrait être dû, au moins en partie, à une prévention de l'apparition d'une sénescence endothéliale prématurée et de la dysfonction endothéliale associée.

Le but du présent projet est donc d'évaluer l'effet protecteur d'un nouvel antidiabétique oral sur l'induction de la sénescence et de la dysfonction endothéliales prématurées liées au diabète de type 2 et au syndrome métabolique. Pour ce faire, des rats âgés de 12 semaines recevront quotidiennement un antidiabétique dans l'eau de boisson pendant 8 semaines. Après euthanasie, les tissus seront prélevés afin de déterminer la (dys) fonction endothéliale et les répercussions vasculaires dans divers organes (reins, cœur, poumons, aorte, artères et veines fémorales, etc.) en utilisant des techniques de réactivité vasculaire *ex vivo*, de biochimie, de biologie moléculaire et d'histologie.

Le nombre maximal d'animaux utilisés pour ce projet est de 88 rats du fait de l'application de la règle des 3R. Le remplacement du modèle animal par un autre modèle n'est pas possible du fait que les altérations vasculaires associées au diabète sont des processus complexes issus des interactions multi-tissulaires dans l'organisme. La réduction des effectifs est liée à l'utilisation de techniques et à une approche statistique adaptée (ANOVA et/ou test non-paramétriques). Enfin, le raffinement se fait par une prise en compte du bien-être animal (enrichissement du milieu et soins quotidiens aux animaux).

5572. Dans la médecine régénératrice, un des objectifs est de reconstituer les tissus ou les organes fonctionnels après une blessure ou une maladie. De nombreuses études se sont intéressées à l'identification du rôle des cellules souches spécifiques dans ce contexte. Cependant, peu de travaux portent sur la régulation du processus physiologique par d'autres constituants tissulaires comme les molécules de l'immunité innée (ex : protéine C3). Le présent projet est une étude pilote ayant pour objectif de déterminer un possible effet de la protéine C3 sur la réparation/régénération du muscle. Pour ce faire, un modèle de lésion musculaire (tibialis antérieur) par le froid sera utilisé chez 12 souris Swiss. 3 autres animaux seront utilisés en cas de besoin, pour une sortie du protocole, ce qui fait un nombre total de 15 animaux dans ce projet.

Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés pour cette étude, 3 animaux/groupe a été choisi pour chaque temps de traitement, permettant ainsi d'avoir une première réponse statistiquement correcte des effets de l'injection de la protéine C3 sur la réparation/régénération du muscle lésé.

Dans ce contexte, 4 groupes de 3 souris seront sacrifiées à 4 temps différents :

Temps 1 : Sacrifice et prélèvement des muscles traités à T+24h après lésion et injection du contrôle (sérum physiologique muscle gauche) ou du traitement (protéine C3 muscle droit)

Temps 2 : Sacrifice et prélèvement des muscles traités à T+48h après lésion et injection du contrôle (sérum physiologique muscle gauche) ou du traitement (protéine C3 muscle droit)

Temps 3 : Sacrifice et prélèvement des muscles traités à T+96h après lésion et injection du contrôle (sérum physiologique muscle gauche) ou du traitement (protéine C3 muscle droit)

Temps 4 : Sacrifice et prélèvement des muscles traités à T+168h (7 jours) après lésion et injection du contrôle (sérum physiologique muscle gauche) ou du traitement (protéine C3 muscle droit). 3 souris supplémentaires pourront être utilisées pour remplacer un animal qui devrait éventuellement sortir du protocole.

Ce projet de recherche respecte au mieux la règle des 3R.

Remplacement : les effets de la protéine C3 étant médiée par le sang, une étude *in vivo* est indispensable. Ainsi, par l'intermédiaire de cet essai pilote, nous pourrions envisager un possible effet de la protéine C3 sur des lésions musculaires induites par le froid et avancer vers de nouveaux protocoles. Ces recherches visent à établir des moyens de prévention et/ou de perspectives thérapeutiques. Réduction : le nombre d'animaux est également choisi pour assurer la réussite du projet (variations significativement différentes des dommages musculaires entre les groupes).

Raffinement : les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure le suivi quotidien. L'hébergement est réalisé dans des cages individuelles, accolées et transparentes, et munies de jouets pour réduire la sensation d'isolement et de stress. Le Raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux afin de vérifier les conditions de bien-être.

5573. Les facteurs environnementaux auxquels nous sommes confrontés quotidiennement sont susceptibles d'impacter le développement de l'être humain. Une alimentation déséquilibrée et l'exposition précoce aux pesticides seraient fortement

incriminées dans l'épidémie d'obésité posant un vrai problème de santé publique. En particulier, la malnutrition et l'obésité maternelles constituent un environnement à risque qui programme le métabolisme des enfants et favorise la survenue d'une obésité ou d'un diabète de type 2 à l'âge adulte. Ce concept d'origine développementale de l'obésité peut expliquer au moins en partie l'épidémie mondiale croissante d'obésité. La région Hauts de France est particulièrement touchée par l'obésité (plus de 20% de la population). Y sont associées des complications comme le diabète de type 2 et les maladies cardio-vasculaires qui entraînent le décès d'au moins 2,8 millions de personnes chaque année. Divers travaux, aussi bien chez l'Homme que l'animal, mettent en avant un rôle des polluants toxiques environnementaux dans la prise de poids et les troubles métaboliques, et notamment les pesticides organophosphorés, parmi lesquels le Chlorpyrifos (CPF), sont suspectés d'avoir des conséquences sur la programmation du métabolisme fœtal et sur la santé de l'individu à long terme. Des expositions précoces à ces molécules ont manifestement leur importance, y compris lorsque ces expositions surviennent bien avant la conception et pendant la gestation (concept de programmation fœtale). Nous posons l'hypothèse qu'une exposition péri-gestationnelle à un pesticide (CPF) dans un contexte d'obésité maternelle potentialiserait la prédisposition de la descendance à l'obésité en altérant la balance énergétique et l'activité métabolique, le fonctionnement intestinal et la communication microbiote-intestin-tissu adipeux-cerveau. L'ingestion d'une fibre alimentaire fermentescible (inuline) dans l'eau de boisson pourrait limiter l'apparition de ces troubles métaboliques selon nos résultats préliminaires. Le sommeil intervient dans la balance énergétique en réduisant les dépenses énergétiques. Il est par ailleurs possible que l'exposition aux pesticides, par ses effets sur l'acétylcholine notamment, puisse avoir des impacts délétères sur le sommeil dont l'importance sur le développement (en particulier du système nerveux central) et sur la santé de l'enfant est avérée. Il a par ailleurs été démontré que des altérations du sommeil conduisaient à des modifications de la prise alimentaire (augmentation de l'apport alimentaire, appétence accrue vers les régimes hyperlipidiques et hyperglucidiques...), des modifications métaboliques glucidiques et lipidiques, précurseurs des risques accrus d'obésité et de syndrome métabolique. Afin de répondre à cette problématique, nous exposerons pendant 4 mois avant gestation puis pendant les périodes *in utero* et de lactation des rates au CPF avec ou sans régime obésogène (High Fat Diet, HFD), en absence ou en présence d'inuline. Après sevrage, les rats recevront une nourriture conventionnelle (non obésogène) pendant 9 semaines en absence de CPF et d'inuline, et nous évaluerons les perturbations de la fonctionnalisation de l'intestin, la mise en place des relations neuro-immuno-endocriniennes, et la composition du microbiote, ainsi que les altérations du sommeil, favorisant la survenue de l'obésité et de troubles métaboliques chez la descendance des femelles (rats). En conclusion, ce projet a pour objectif de déterminer si une exposition continue péri-gestationnelle au CPF, associé ou non à un régime obésogène, modifie le bilan énergétique et favorise ainsi la survenue d'obésité et de troubles métaboliques chez le rat en cours de développement. Ces pathologies pourraient se développer notamment via des altérations de la programmation de l'axe microbiote-intestin-tissu adipeux-cerveau et de leurs voies de communications, impliquées dans les dérèglements du bilan énergétique.

L'espèce de rat Wistar a été choisie car c'est une espèce reconnue et couramment utilisée pour les études sur l'implication de l'axe microbiote-intestin-tissu adipeux-cerveau dans les pathologies ainsi que les études sur la balance énergétique, le comportement (alimentaire, sommeil), et pour lesquelles il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale. Pour cette étude, les géniteurs seront au nombre de 32 femelles et 16 mâles. Quatre femelles gestantes sont prévues pour chacun des groupes expérimentaux (8 groupes au total). Afin d'obtenir 12 rats mâles et 12 rats femelles par groupe expérimental, les 4 femelles prévues seront nécessaires pour chacun des groupes. Les études de sommeil seront notamment réalisées sur les rats femelles de chaque portée. Le nombre d'animaux maximum de la descendance prévu pour cette étude est de 192 rats (24 x 8 groupes expérimentaux) afin d'obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs. Afin d'assurer le bien-être des animaux, des moyens antalgiques appropriés seront utilisés au cours des procédures et l'enrichissement sera effectué par ajout de frisettes de papier ou de nids végétaux.

5574. L'atrophie multi systématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative sporadique rare et d'étiologie inconnue touchant plus de 3000 personnes en France. L'AMS se traduit par un syndrome parkinsonien et une ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires), conduisant à une grave invalidité motrice, ainsi que par une dysautonomie engendrant des troubles respiratoires, cardiaques et urogénitaux. L'espérance de vie moyenne après la déclaration de l'AMS est inférieure à 9 ans et il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement disponible pour atténuer la sévérité des symptômes ou la progression de cette maladie dévastatrice. Au niveau du tissu cérébral, l'AMS se caractérise par la présence de la protéine alpha-synucléine (SYN) agrégée dans un type de cellules nerveuses, les oligodendrocytes. La présence de l'accumulation toxique de cette protéine, l'AMS fait partie de la famille des « synucléinopathies » avec la maladie de Parkinson et la démence à corps de Lewy ou l'agrégation d'alpha-synucléine à lieu dans les neurones. Selon plusieurs données expérimentales, l'agrégation de la SYN serait à l'origine des déficits moteurs et du processus neurodégénératif de l'AMS. Du fait de la gravité, de la rapidité et de la généralisation du processus neurodégénératif, le développement de traitements neuroprotecteurs capables de ralentir l'évolution de la maladie constitue un besoin urgent.

Plusieurs données bibliographiques suggèrent qu'une autre protéine, la tyrosine kinase Abelson (c-Abl) est impliquée dans la physiopathologie des synucléinopathies telles que la maladie de Parkinson et la démence à corps de Lewy.

En effet, la c-Abl empêche la dégradation d'alpha-synucléine dans les neurones permettant son accumulation en quantité toxique. Plusieurs études ont démontré un effet bénéfique d'une molécule le nilotinib, inhibant l'action de la c-Abl sur l'agrégation d'alpha-synucléine et la neurodégénérescence dans des modèles précliniques de maladie de Parkinson. Cette molécule actuellement est utilisée pour de traitement de certaines formes de leucémie. Aucune donnée n'existe à l'heure actuelle sur le potentiel neuroprotecteur du nilotinib dans l'AMS. Nous disposons d'un modèle de souris transgénique d'AMS sur-exprimant l'alpha-synucléine dans les oligodendrocytes (PIPSyn) et présentant une neurodégénérescence. Nous évaluerons l'effet d'un traitement chronique de 12 semaines par le nilotinib (2 doses testées : 1 et 10 mg/kg) sur la survie neuronale et l'agrégation

d'alpha-synulcine afin d'évaluer l'intérêt du nilotinib comme traitement pour l'AMS. Le comportement moteur des animaux de chaque groupe, avant le prélèvement de leur cerveau pour des analyses histologiques.

Dans le respect de la règle des 3R afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse de puissance a été effectuée, permettant de réduire le nombre à 32 souris incluant les groupes expérimentaux et leurs contrôles. Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée actuelle n'indique que le nilotinib soit susceptible d'entraîner une souffrance chez les animaux. La dégénérescence des neurones que l'on observe, n'entraîne pas de phénotype dommageable chez cette lignée transgénique utilisée. Les tests comportementaux réalisés feront appel au comportement moteur spontané de l'animal sans contention. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape.

5575. Les lymphomes cérébraux primitifs (LCP) sont des lymphomes (maladie hématologique maligne) atteignant le système nerveux central (cerveau, œil, liquide céphalorachidien et moelle épinière). Ce sont des maladies rares (environ 300 nouveaux cas par an en France) et de mauvais pronostic avec les traitements actuels. Compte tenu de la rareté de la maladie et de sa gravité, il n'est pas possible de « tester » de nouvelles associations directement chez l'homme. De plus la particularité des LCP réside en partie dans leur localisation au niveau du système nerveux central (SNC). Le SNC présente une barrière anatomique et fonctionnelle au niveau de la barrière hémato-encéphalique qui limite le passage au niveau du SNC des traitements dirigés contre le lymphome. La biodisponibilité au niveau cérébrale de la plupart des médicaments contre le lymphome n'est, le plus souvent, pas connue de l'industrie pharmaceutique. Il est essentiel de s'assurer que des molécules potentiellement efficaces contre les lymphomes, soient efficaces dans le cas particulier des atteintes cérébrales, et ceci ne peut se faire que sur des modèles animaux. Les études précliniques chez l'animal sont donc nécessaires pour mieux sélectionner les médicaments et les associations de médicaments qu'il serait utile d'évaluer chez l'homme.

Notre molécule d'intérêt est une petite molécule dont le mécanisme d'action laisse présager de son efficacité dans les LCP. L'objectif du projet est d'évaluer l'efficacité de cette molécule seule mais aussi en association avec d'autres médicaments habituellement utilisés dans les LCP, sur un modèle murin. Les résultats de notre étude nous aideront d'une part, à valider l'efficacité de cette molécule dans cette localisation particulière de lymphome et d'autre part à choisir la meilleure association de chimiothérapie qui pourra être proposée dans le cadre d'étude clinique chez l'homme. Nous utilisons un modèle de lymphome cérébral établi chez la souris adulte. Dans un premier temps nous effectuerons des dosages de notre molécule dans le cerveau de souris avec ou sans lymphome pour vérifier le passage du médicament au sein de la tumeur et du tissu sain. Puis nous testerons son efficacité seule ou en association avec 5 autres molécules toujours comparée à un groupe contrôle, c'est-à-dire non traité. Les traitements seront administrés selon les bonnes pratiques relatives aux volumes d'administration soit par voie orale (gavage ou mélangé à l'eau directement dans le biberon, soit par voie intrapéritonéale (piqûre dans l'abdomen) soit par voie intraveineuse et à des doses déjà validées chez la souris quant à leur toxicité et efficacité. Dans certains cas les cerveaux sont prélevés après euthanasie à la fin d'expérience pour des analyses histologiques.

En accord avec les réglementations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

Au total, ce projet utilisera sur une période de 5 ans, 314 souris.

5576. Si les élevages ovins allaitants sont plutôt autonomes en matière de ration totale et fourrages, l'autonomie en concentré est beaucoup plus faible avec 36 %. Celle en protéines se situe seulement à 28 %.

D'autre part, le coût de production de la viande ovine a fortement progressé ces dernières années sous l'effet de la flambée des prix des matières premières. Par exemple, le poste des tourteaux est passé d'un indice de 72 en janvier 2005 à 120 en août 2015 selon l'indice IPAMPA. Ainsi, ce contexte conjoncturel et fortement volatile s'annonçant durable, la maîtrise du coût de production en élevage constitue donc un enjeu essentiel de compétitivité de la filière et de durabilité des élevages.

En effet, même si la production ovine reste fortement basée sur la valorisation de l'herbe, la consommation de concentrés (majoritairement achetés) y occupe une place non négligeable avec de 69 à 170 kg de concentrés par couple mère/agneaux selon la zone et est en constante évolution, rendant ces systèmes tout particulièrement sensibles au prix des aliments.

Pourtant, plusieurs indicateurs semblent indiquer la possibilité de diminuer le taux d'azote dans les rations pour agneaux de bergerie. Face à l'augmentation des matières premières les fabricants d'aliments se sont adaptés au coût élevé des sources azotées et proposent des aliments dosant 15 à 16 % de MAT sur la matière brute à un prix inférieur à la gamme classique positionnée sur 17 à 18 % de MAT et correspondant aux recommandations classiquement conseillées depuis les années 1980. Des essais réalisés sur agneaux sevrés dans le bassin laitier de Roquefort, dont les résultats sont restés confidentiels cependant, témoigneraient de performances comparables des agneaux. Enfin, les résultats d'un essai réalisé en 2014 ne mettaient pas en évidence de différence d'indices de consommation ni de qualités de carcasse entre deux aliments de commerce dosant 15 et 18 % de MAT.

De plus, d'un point de vue environnemental, si ces résultats étaient confirmés, ils pourraient permettre de réduire les rejets azotés qui peuvent représenter jusqu'à 70 % de l'azote ingérée pour certains systèmes de ruminants. Bien qu'incontournables, les rejets azotés doivent être maîtrisés puisqu'ils peuvent être une source de pollution importante, selon leur forme d'élimination. L'azote urinaire (urée) est soit rapidement transformé en ammoniac, puis volatilisé en oxyde nitreux, gaz à effet de serre dont le pouvoir réchauffant est 298 fois supérieur au CO₂ sur 100 ans, soit converti en nitrate et lixivié s'il n'est pas rapidement utilisé par les plantes. Quant à l'azote fécal, essentiellement de l'azote organique, il est peu soluble ou susceptible de se volatiliser. C'est donc la voie d'élimination à privilégier.

Pourtant, malgré les prix attractifs de ces aliments moins riches en azote, faute de référence sur les effets des aliments qui présentent un faible taux azoté sur les performances, indices de consommation et qualités de carcasse, les techniciens de développement agricole se trouvent démunis d'arguments pour conseiller objectivement les éleveurs dans leur choix.

Les objectifs de cette étude sont doubles. Il s'agit d'une part de préciser le niveau azoté optimum des rations pour des agneaux finis en bergerie. La mise en place d'essais dans 4 sites expérimentaux permettra de comparer les effets de différents niveaux d'apports azotés sur des types génétiques différents et deux formes de présentation de l'aliment (aliment complet/mélange fermier). Au-delà des performances zootechniques, la qualité des carcasses (dont l'état d'engraissement) sera évaluée. L'essai concerné par cette demande permettra quant à lui d'étudier les mécanismes physiologiques en jeu. Pour cela 24 agneaux seront mobilisés chaque année (lors de première année des mâles puis uniquement des femelles), répartis en 3 lots de 8 animaux et alimentés avec 3 concentrés avec des teneurs azotées différentes 13, 15 et 18%. Ils seront conduits individuellement du sevrage à l'abattage afin de déterminer la variabilité de réponse à un traitement alimentaire et feront l'objet de deux périodes de digestibilités et prises de sang pour mesurer leur efficacité alimentaire individuelle.

Ce projet répond ainsi à l'objectif d'amélioration des techniques et conduites d'élevage pour la performance économique des élevages sous l'angle alimentaire et à celui de la performance environnementale avec les approches en lien avec l'autonomie protéique et la réduction des impacts climatiques.

Les différences de réponses (ingestion, digestion, comportements) des agneaux aux régimes alimentaires seront évaluées par des mesures de prises alimentaires, comportementales et zootechniques. Compte-tenu de la variabilité interindividuelle de ces mesures, le nombre d'animaux nécessaire pour mettre en évidence une différence au moins égale à 2 fois la valeur de l'écart-type des fidélités intermédiaires des mesures est de 6 avec une probabilité de 0.05, et de 8 avec une probabilité de 0.01. Huit individus par groupe sont donc nécessaires à l'obtention d'une puissance statistique suffisante pour l'analyse des résultats. Pour les mesures de digestibilité, les effectifs sont réduits au maximum avec 6 animaux par traitement. Il faut donc 24 agneaux mâles et femelles soit un total de 48 individus sur les deux ans du projet.

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet et de cette demande, premièrement il n'est pas possible de remplacer l'animal dans cette étude car il n'existe pas de méthode alternative fiable pour valider nos objectifs scientifiques. Deuxièmement les effectifs animaux ont été limités et réduits au maximum tout en permettant d'obtenir des résultats fiables. Troisièmement, tout est mis en œuvre pour raffiner les procédures expérimentales en utilisant par exemple un dispositif pour faire des mesures d'ingestion individuelle en lot. Si les résultats de la première année sont concluants, la deuxième année, la procédure 1 (conduite en case individuelle) sera supprimée. De plus les animaux seront suivis quotidiennement pour s'assurer de la bonne santé des animaux.

5577. Les troubles neurologiques affectent près d'un milliard de personnes dans le monde. L'allongement de l'espérance de vie est un des facteurs de risque majeurs à l'augmentation de ces maladies. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent.

Les maladies neurologiques ont toutes des causes et des origines différentes dont les plus connues sont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la schizophrénie et les accidents vasculaires cérébraux.

Nous avons à disposition des modèles de souris transgéniques mimant certaines pathologies cérébrales par l'expression ou la suppression de gènes d'intérêt qui ont une incidence sur l'apparition et l'installation des maladies neurologiques.

Ces souris sont des modèles précliniques, à forte valeur translationnelle à l'homme, qui permettent l'identification de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles dans ces pathologies.

Le but de notre projet est de caractériser de nouvelles souches de souris transgéniques à différents âges d'une même lignée. La caractérisation de ces animaux permettra de connaître le degré d'atteinte fonctionnelle sur le plan comportemental par l'étude des fonctions cognitives (apprentissage et mémoire), des capacités sensorimotrices, des états émotionnels, des conséquences sur des paramètres métaboliques (prise de nourriture et de boisson, fonction urinaire, fèces) et biochimiques (expression de biomarqueurs spécifiques). Les études de ce projet seront commencées chez des animaux jeunes adultes et poursuivies tout au long de leur vieillissement afin de suivre l'installation des processus pathologiques.

Les lignées de souris transgéniques montrant clairement des signes comportementaux anormaux à un âge donné seront utilisées ensuite, dans le cadre d'autres projets, pour sélectionner des candidats médicaments efficaces.

On peut estimer sur la durée du projet (5 ans), une utilisation maximum de 5400 animaux. Il est envisagé d'étudier plusieurs types de souris transgéniques dont les processus d'instauration des pathologies sont différents.

L'étude des fonctions cognitives, sensori-motrices, des états émotionnels et le suivi de paramètres métaboliques et biochimiques ne peut se faire que sur l'animal entier et la souris est un modèle pour lequel la communauté scientifique dispose de nombreuses données sur l'étude de ces différentes fonctions. Le nombre de tests dans lesquels une souris sera évaluée tout au long de sa vie sera optimisé (par exemple la souris sera testée dans plusieurs tests sensorimoteurs, ou un test cognitif puis des tests sensorimoteurs) de manière à réduire le nombre total de souris à utiliser pour la caractérisation de leur lignée. Ces différents tests occasionnent peu de souffrance (stress ou douleur) et sont réalisés sur des durées très courtes et avec possibilité d'échappement de la souris.

Les souris seront stabulées en groupe et leurs cages seront enrichies de tubes de cellulose pour favoriser leur instinct de nidification. Une évaluation régulière de chaque animal sera effectuée pour permettre de suivre l'état de santé général et de suivre de façon plus précise l'évolution et l'installation de la physiopathologie chez les souris transgéniques, par rapport aux souris témoins placées dans les mêmes conditions. Cette évaluation permettra de contrôler et de maîtriser tout risque de souffrance des animaux par l'application des points limites si nécessaire. Les résultats des différents tests aux différents âges pourront enfin

permettre d'identifier d'éventuels signes précurseurs de points limites ou limites d'âges applicables pour l'utilisation ultérieure de ces souches.

5578. Un nombre conséquent d'étudiants en pharmacie et la majorité des étudiants du master « sciences du médicament » sont appelés à être de futurs cadres dans l'industrie pharmaceutique. Pour les former à leur pratique professionnelle, certains enseignements se font sous forme pratique : les travaux pratiques ou TP. Dans les TP de Physiologie/Pharmacologie nous illustrons les effets de certains médicaments étudiés en théorie lors des cours. Les protocoles utilisés lors de ces TP sont semblables à certains des protocoles utilisés pour l'évaluation et la validation de l'effet d'un médicament. Sur un rat anesthésié et préparé par les enseignants, les étudiants injectent par une veine le médicament qu'ils étudient, puis mesurent les effets de ce médicament sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque.

Pour ces TP, nous avons prévu d'utiliser 190 rats sur une période de 5 ans. Afin de limiter l'utilisation d'animaux, nous avons remplacé, réduit et raffiné nos pratiques éducatives.

Remplacer :

La mise en œuvre de ces expériences « réelles » est nécessaire à la formation spécifique des Pharmaciens et étudiant en Master. En effet, le modèle animal est le seul qui permet une analyse globale de la réponse à un médicament : présence du système nerveux et interaction de tous les organes.

Nous disposons en parallèle, de logiciels de simulation d'expériences (Enseignement Assisté par Ordinateur, EAO). Ces logiciels représentent des outils pédagogiques offrant une alternative intéressante aux traditionnelles préparations utilisées en TP. Néanmoins, ces logiciels sont très limités dans le choix et le réalisme des expériences proposées. Ces logiciels nous permettent de remplacer, pour des contenus pédagogiques précis, des animaux: environ 50% des séances sont réalisées en EAO. Par contre, les molécules testées sont synthétisées par les étudiants, donc l'EAO ne peut mimer les variations physiologiques induites par les différences de synthèse. Nous ne pouvons pas nous affranchir du modèle animal pour cette partie des TP. Ces expériences d'EAO permettent toutefois de remplacer une trentaine de rats.

Réduire :

Afin de limiter l'utilisation d'animaux, les étudiants sont répartis en binôme ou trinôme pour cette série de TP, ce qui est la taille limite pour que l'intérêt pédagogique de cet enseignement subsiste.

Raffiner :

Pendant la période des TP, les rats sont hébergés par 2 dans des cages de 820 cm² avec un enrichissement. Les expérimentations se font sous anesthésie profonde d'environ 2h et les enseignants contrôlent la profondeur de l'anesthésie avant la chirurgie et pendant toute la durée du TP. Les enseignants anesthésient les animaux puis posent les voies d'injection et de mesures.

5579. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie vasculaire pulmonaire rare et grave, caractérisée par l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires, aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. Cette insuffisance cardiaque droite conduit au décès prématuré d'adultes encore jeunes, le traitement de cette maladie étant peu satisfaisant avec une surmortalité de 7.5% chez les 20-30 ans. Ainsi, la découverte de nouveaux traitements apparaît primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Récemment, la thérapie génique, qui repose sur le transfert de gènes, a ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques en cardiologie et des études expérimentales ont prouvé son efficacité pour améliorer la contraction du muscle cardiaque après un infarctus du myocarde. Cependant, peu d'études ont été menées sur le ventricule droit défaillant.

Avant de tester cette thérapie prometteuse chez les patients, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche et l'efficacité de la thérapie génique sur un modèle animal. Le but de notre projet est d'évaluer la faisabilité et l'efficacité d'un transfert de gènes dans les cellules des vaisseaux pulmonaires et cardiaques.

Concernant les maladies cardiovasculaires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine de par l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques cardio-vasculaires comparables à celles de l'homme.

Avant de débiter cette étude, des expériences sur des modèles de rongeurs ont été effectuées afin de réaliser la preuve de concept.

Le chercheur responsable sera assisté dans sa démarche par des chirurgiens cardiaques congénitaux et des cardiopédiatres afin de favoriser les procédures non invasives (échographie cardiaque), d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire ainsi le nombre d'animaux sacrifiés.

Pour la totalité du projet, nous utiliserons au maximum 36 animaux. Afin de réduire le nombre d'animaux, les organes des animaux d'un groupe serviront de témoin pour l'autre groupe, ce qui permet de ne pas réaliser de groupe témoin.

L'ensemble de cette procédure sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2m² (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire ainsi les stress. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de fouissement encouragée, « médecine ball », jeux dans le couloir, pesée sous forme de jeux avec récompense, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...). Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettront de veiller au bien-être des animaux.

5580. L'organisation mondiale de la santé considère aujourd'hui le diabète comme une priorité sanitaire. Environ 5% des patients diabétiques souffrent du diabète auto-immun de type 1, la maladie métabolique la plus fréquente chez l'enfant dans les pays développés. De nos jours, il n'existe pas de traitement curatif sûr pour cette pathologie. Notre projet a pour but de développer une stratégie curative dans le diabète de type 1 (DT1) dans un modèle murin de diabète auto-immun. En effet, l'administration d'auto-antigènes dans le but de restaurer la tolérance immunitaire aux cellules bêta est l'une des approches les plus attrayantes. La souris de souche NOD (non-obèse diabétique) est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le diabète auto-immun et la réponse immunitaire diabétogène. Notre projet consiste à administrer à ces souris des nanoparticules (NPs) d'oxyde de fer permettant de co-transporter deux traitements : une molécule tolérogène et un auto-antigène dans le but d'induire une rémission. Quatre traitements distincts seront injectés par voie intraveineuse au début du développement de la maladie chez la souris : des NPs ne transportant aucun traitement, des NPs transportant uniquement la molécule tolérogène ou l'autoantigène, et, finalement, des NPs co-transportant les deux traitements. Ces différents traitements permettront à la fois d'évaluer la rémission des souris diabétiques mais également d'examiner leur impact sur le système immunitaire à court et à moyen terme. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont déjà utilisées en clinique en tant qu'agent de contraste d'IRM et sont approuvées par la FDA. Ainsi, le recul toxicologique et leurs effets sur l'organisme sont bien connus et les doses utilisées lors de ce projet sont inférieures aux doses toxiques. Toutes les expérimentations sur l'animal seront conduites en respectant la règle des 3R. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement robustes : certains paramètres expérimentaux, tels que le choix des lots testés et les doses seront déterminés par des expériences *in vitro* permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 820 souris. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. L'état général de l'animal, la perte de poids, l'apparence et le comportement de l'animal seront suivis quotidiennement après les traitements. L'accès à l'eau pour une bonne hydratation des animaux diabétiques sera contrôlé quotidiennement. Dans l'ensemble des expériences, les animaux devenant diabétiques seront suivis quotidiennement. Dans les cas où une rémission après traitement ne sera pas observée, ils seront euthanasiés après une mesure de glycémie > 600mg/dL. Ceci constitue un point limite de l'expérience. Les études mécanistiques seront principalement menées sur des animaux en rémission après traitement ou bien en stade pré-diabétique tardif. Dans l'ensemble des expériences, les animaux devenant diabétiques seront suivis quotidiennement. Nous réaliserons des études de biodistribution et de pharmacocinétique de deux lots de nanoparticules, l'une contrôle et l'autre d'intérêt, par imagerie IRM sous anesthésie. Le but de cette étude est le suivi de l'accumulation des nanoparticules vers les sites d'intérêts comme le pancréas et les ganglions pancréatiques.

5581. De nombreux domaines de la médecine ont connu des progrès significatifs au cours des dernières années. L'un des domaines où les avancées sont remarquables est la chirurgie. Ces progrès sont dû à l'émergence de trois nouveaux concepts qui sont les techniques de : laparoscopie, endoscopie et radiologie interventionnelle (chirurgie percutanée). L'imagerie médicale est devenue un complément essentiel à la bonne pratique de la chirurgie. Le développement de la chirurgie guidée par l'image est aujourd'hui en plein essor et permet le développement permanent de nouveaux protocoles et de nouvelles interventions moins invasives et plus efficaces.

La chirurgie percutanée ou « la radiologie interventionnelle » est une technique d'intérêt en pleine croissance. Elle a permis de mettre en place des procédures performantes guidées uniquement par des images. Ces dernières peuvent être des images tomographiques, échographiques, fluoroscopiques ou combinées. En complément, des petites aiguilles, des guides et des cathéters ont été développés par plusieurs industriels spécialisés. De nombreuses méthodes ont été développées ces dernières années dans le but de remplacer la chirurgie ouverte qui nécessite de réaliser de grandes incisions moins précises et plus invasives pour le patient. D'autre part la chirurgie percutanée permet d'améliorer la réhabilitation post-opératoire en diminuant la douleur ressentie, le taux d'infections post-opératoires et le temps d'hospitalisation.

Afin de poursuivre le développement de nouvelles procédures chirurgicales, le chirurgien doit être en mesure d'acquérir de nouvelles compétences en lien avec ces nouvelles techniques d'imagerie médicale. D'autre part, la création et la formation d'équipes multidisciplinaires combinant la chirurgie et la radiologie sont nécessaires.

Face à ces nouvelles techniques, les équipes médicales ont besoin de la mise en place de nouveaux développements dans le domaine de l'imagerie médicale, tels que la création de logiciel de fusion d'images ou encore de salles d'opération hybrides.

Le projet vise à tester des techniques innovantes en chirurgie percutanée permettant de réaliser des interventions complexes tout en diminuant les caractères indésirables en lien avec la chirurgie telle que la douleur post-opératoire, le taux d'infection ou encore le temps d'hospitalisation.

Le projet répond aux conditions 3R:

Remplacement: afin de tester les complications, la durée des procédures, la sûreté et l'efficacité des approches percutanées dans le tractus digestif en phase préclinique, il est nécessaire d'utiliser des animaux vivants. Le cochon est le modèle le plus répandu dû à sa taille ainsi que son anatomie abdominale.

Réduction: il s'agit d'une étude pilote pour laquelle il n'y a pas de base statistique sur laquelle nous pourrions définir le nombre d'animaux nécessaires. Cependant, le nombre d'animaux utilisés pour chaque test a été optimisé afin de minimiser la quantité nécessaire. Ainsi, en accord avec le principe de réduction et basé sur notre expérience, nous estimons que 16 animaux seront nécessaires pour cette étude.

Raffinement: il est prévu que toutes les procédures soient effectuées sous anesthésie générale et avec un contrôle de la douleur pendant l'opération, ainsi que durant la phase de réveil et de survie. Le protocole d'anesthésie fait appel aux techniques de suivis anesthésiques les plus performantes. Les procédures expérimentales seront réalisées par du personnel qualifié et expérimenté (chirurgiens et radiologues interventionnels séniors, techniciens anesthésistes) afin d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire le

temps interventionnel ainsi que le nombre d'animaux nécessaires. Pour améliorer le bien-être de nos animaux avant et lors de nos interventions, nous prendrons soin de leur fournir un environnement adapté à chaque phase de l'expérimentation. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (présence de jouets, de musique...).

5582. En situation d'urgence extrahospitalière, il est primordial de différencier l'état hémodynamique du patient (état syncopal ou arrêt cardiaque) afin de lui apporter les traitements appropriés. Le cerveau étant l'organe le plus menacé dans ces situations, une hémodynamique adéquate se définit par une pression de perfusion cérébrale supérieure à 70 mm Hg. Or cette information n'est pas accessible lors de la prise en charge du patient. La prise de pouls manuelle par des profanes ou les premiers secours n'offre pas une estimation fiable de cette pression et retarde le massage cardiaque. Depuis les recommandations de l'European Resuscitation Council (ERC) de 2010, la prise de pouls manuelle n'est plus conseillée. Il apparaît donc nécessaire de créer un détecteur de l'hémodynamique.

L'impédance cardiographie est actuellement utilisée dans le milieu intra-hospitalier comme estimateur du volume d'éjection cardiaque. Des études ont ensuite montré que l'impédance transthoracique mesurée par les électrodes de défibrillations est un marqueur de la présence de pouls pendant l'arrêt cardiaque.

D'autre part, de récentes études ont montrés que les mouvements enregistrés par un accéléromètre étaient des marqueurs de l'activité cardiaque.

L'objectif est donc de réaliser au sein d'un défibrillateur, un détecteur hémodynamique par analyse de l'électrocardiogramme, de l'impédance-cardiogramme et de signaux issus de centrales inertielles. Ce dispositif apportera une aide au diagnostic aux premiers intervenants lors d'interventions extrahospitalières.

Cette étude a pour but de valider l'utilisation de ces signaux comme marqueurs hémodynamiques en étudiant la corrélation entre les variations de la pression invasive carotidienne, les variations de l'impédance transthoracique et les variations de mouvements mesurées au niveau des électrodes de défibrillation. Trois procédures expérimentales conduisant à des variations de l'hémodynamique de l'animal sont déroulées. Lors de la première procédure, des épisodes de tachycardie ventriculaire sont induits et conduisent à la diminution du volume d'éjection cardiaque et ainsi de la pression invasive. La deuxième consiste en un épisode de fibrillation ventriculaire suivi d'une réfibrillation par choc électrique externe. Les variations du volume d'éjection et de pression invasive mesurées lors de la fibrillation puis lors du retour à une circulation spontanée sont mesurées. Enfin, la troisième procédure expérimentale, consiste à simuler une activité électrique sans pouls en provoquant l'arrêt des contractions mécaniques du cœur. Cette dernière procédure mène à la mort de l'animal.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

Remplacement : Ce projet de recherche requiert l'utilisation d'animaux vivants afin de permettre l'évaluation de l'hémodynamique de l'arrêt cardiaque de manière contrôlée. Ce type de monitoring ne peut être mis en place sur l'homme de par l'urgence des soins à effectuer. De par sa morphologie thoracique et vasculaire proche de celle de l'homme, le porc sera utilisé comme modèle d'étude.

Réduction : Dans le but de minimiser l'utilisation d'animaux, les 3 procédures expérimentales sont déroulées sur chaque animal afin de limiter le nombre de sujets inclus dans l'étude. Le test statistique « Student's t-test » est utilisé afin de définir le nombre de sujets à inclure. De précédentes études ont établies que des paramètres issus de l'impédance thoracique permettent d'identifier l'arrêt cardiaque avec une taille d'effet centré réduit de 1.39. En fixant un taux d'erreur de type I à 0.05 et de type II à 0.20, 4 animaux sont nécessaires pour mener à bien cette étude. Néanmoins, nous utiliserons 6 animaux dans l'éventualité où la puissance de test obtenue avec nos signaux soit plus faible et afin de parer aux aléas lors des procédures (incapacité à défibriller l'animal, signaux artéfactés, ...).

Raffinement : Le projet prévoit des procédures réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle de la douleur peropératoire. L'euthanasie en fin de procédure sera effectuée sans réveil pour ne pas engendrer de souffrances animales.

5583. Lorsqu'une artère est obstruée par un caillot sanguin, ou thrombus, les conséquences peuvent être dramatiques s'il n'est pas éliminé ou retiré rapidement. En effet, lorsqu'il se situe au niveau du cerveau, il peut être à l'origine d'un accident vasculaire cérébral (AVC). Près de 1.5 millions de nouveaux cas d'AVC sont recensés chaque année sur les principaux territoires occidentaux. Dans la prise en charge de l'AVC, chaque minute compte : le temps de reperfusion (rétablissement du flux sanguin) est directement corrélé avec la probabilité de moindres séquelles pour le patient. Si le traitement des AVC a longtemps été limité à la seule voie chimique (dissolution du caillot induite par la prise de médicaments), il existe aujourd'hui une nouvelle technique très prometteuse qui consiste à retirer physiquement le caillot pour rétablir la circulation cérébrale: la thrombectomie mécanique. Le praticien dispose de deux méthodes afin de réaliser cette intervention : aspirer le caillot avec un cathéter d'aspiration, ou emprisonner le caillot dans un stent soudé au bout d'un cathéter (un stentriever) et tirer sur le cathéter pour retirer le caillot. Il a été montré que le succès de l'une ou l'autre méthode dépend fortement de la nature du caillot obstruant l'artère, c'est-à-dire de sa composition en globules rouges, en plaquettes, ou en fibrine. Hors à ce jour aucune technique ne permet de renseigner le praticien sur la nature du caillot.

Des capteurs micrométriques ont été développés afin de détecter, de façon instantanée, des caillots de composition différente. Ces capteurs viennent instrumenter des guides vasculaires couramment utilisés lors des interventions neurovasculaires. Les expériences *in vitro* sont prometteuses, mais l'environnement vasculaire réel qui sera au contact du capteur dans le patient ne peut pas être reproduit au laboratoire. En particulier, l'interaction entre la paroi des artères et le caillot, ainsi que l'altération du flux sanguin par le caillot, influencent de façon importante la mesure électrique réalisée par le capteur. Avant de tester les guides

instrumentés chez l'Homme, il est donc indispensable de vérifier, chez l'animal, qu'ils fournissent au praticien une information pertinente et robuste.

Le modèle d'étude choisi est celui du porc, pour sa physiologie vasculaire très proche de celle de l'Homme, à la fois dans sa composition du sang et dans ses caractéristiques cardiovasculaires. Au total 22 animaux seront requis pour cette étude.

Globalement, la procédure expérimentale consiste en l'implantation d'un thrombus autologue puis analyse *in vivo* du thrombus par le guide instrumenté. Le protocole prévoit d'abord l'analyse de thrombi de composition simple puis l'analyse de thrombi de composition plus élaborée, reproduisant la complexité des caillots retrouvés chez les patients atteints d'AVC.

Respect des 3R :

Remplacement : Les expériences *in vitro* sont prometteuses, mais l'environnement vasculaire réel qui sera au contact du capteur dans le patient ne peut pas être reproduit au laboratoire

Avant de tester les guides instrumentés chez l'Homme, il est donc indispensable de vérifier, chez l'animal, qu'ils fournissent au praticien une information pertinente et robuste.

Réduction : Afin d'augmenter la statistique de mesure sans augmenter le nombre d'animaux, plusieurs thrombi seront implantés et analysés par animal.

Raffinement : Les animaux seront sous anesthésie générale durant toute la durée de l'opération puis seront sacrifiés dans la journée, sans phase de réveil, évitant ainsi angoisse et douleur. Le protocole d'anesthésie fait appel aux techniques de suivis anesthésiques les plus performantes. Les procédures expérimentales seront réalisées par du personnel qualifié et expérimenté (chirurgiens et neuroradiologues interventionnels séniors, techniciens anesthésistes) afin d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire le temps interventionnel ainsi que le nombre n'animaux nécessaires. Pour améliorer le bien-être de nos animaux avant et lors de nos interventions, nous prendrons soin de leur fournir un environnement adapté à chaque phase de l'expérimentation. Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (Présence de jouets, de musique...).

5584. Dans le domaine de la cancérologie, les traitements employés se divisent en 3 groupes : la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Dans ce dernier groupe, de nouvelles modalités ont été développées comme l'irradiation par un faisceau d'ions qui possèdent des propriétés physiques et biologiques qui leurs confèrent des avantages significatifs par rapport aux rayons conventionnels (rayons X) utilisés en clinique. C'est cette modalité d'irradiation qui sera étudiée dans ce protocole.

Contrairement à ces rayons conventionnels, cette technologie permet de déposer le maximum d'énergie au sein d'un volume cible circonscrit (la tumeur), tout en épargnant les tissus sains en amont et en aval. Grâce à ces propriétés, alliées à une faible diffusion latérale, la dose déposée dans les tissus peut être strictement confinée au volume cible avec une précision nettement plus grande qu'en radiothérapie conventionnelle. Ainsi, la dose d'irradiation reçue par le patient et la morbidité sont moindres.

Notre étude consiste à comparer, dans un modèle tumoral induit par injection en sous cutané de cellules cancéreuses chez la souris NMRI immunodéficiente, les effets biologiques d'une irradiation proton associée à une chimiothérapie sur la tumeur en imagerie. Ces effets seront comparés à ceux obtenus lors d'une chimiothérapie seule. La chimiothérapie employée est le topotecan administré à la dose de 1.25 mg/kg/j pendant 2 semaines (2 périodes de 5 jours)

L'irradiation sera faite soit au début de la 1ère semaine soit au début de chaque bloc de traitement afin de comparer les effets biologiques de l'irradiation en fonction du temps. Les effets biologiques induits par cette irradiation unique de 10Gy seront évalués par une étude longitudinale en imagerie TEP de 28 jours au cours de laquelle la souris aura 5 séances d'imagerie avec un traceur ciblant la prolifération (FLT) soit le métabolisme cellulaire (FDG) ou l'apoptose (ML10).

Afin d'obtenir des données significatives du point de vue statistique, nous utiliserons des lots de 20 souris par condition, ce qui amènerait le nombre total d'animaux à 360. En fin d'étude après la mise à mort des animaux, les tumeurs seront prélevées pour des études histologiques et biochimiques complémentaires. Les animaux sont hébergés dans des cages ventilées avec des filtres à l'entrée et à la sortie de la cage.

La règle des 3R sera appliquée. Cette étude ayant pour objectif de suivre les effets biologiques d'une irradiation proton sur la tumeur, celle-ci ne peut s'appliquer sur une étude *in vitro* car nous n'aurions pas l'implication du tissu environnant (vascularisation) sur les effets de cette irradiation. L'utilisation de l'imagerie permet de suivre l'évolution de paramètres biologiques sur le même animal sur plusieurs jours, réduisant ainsi le nombre d'animaux. La douleur et la souffrance seront prises en compte par un suivi quotidien des animaux avec une grille de notation de la douleur et de la croissance tumorale qui déterminera les points limites (20% de perte de poids et volume tumoral de 2000 mm³) nécessitant une éventuelle mise à mort de la souris. En cas de douleur, des analgésiques seront utilisés pour y remédier. Les animaux sont hébergés à plusieurs par cage avec un enrichissement.

5585. L'évolution et l'adaptation des organismes à leur environnement dépendent de leur capacité à survivre et à se reproduire. Pour de nombreuses espèces, la probabilité de survie ou la fécondité de chaque individu est fortement influencée par sa taille et/ou son poids. C'est pour cela qu'en écologie évolutive il existe de nombreux travaux sur les facteurs qui influencent la croissance des organismes. Ces facteurs sont variés, la croissance peut par exemple être influencée par : la physiologie (assimilation de la nourriture), le comportement (recherche alimentaire), l'environnement (disponibilité en nourriture), les soins parentaux... Comme pour tout trait phénotypique, il existe une part de la variation entre individus qui est expliquée par les gènes, une autre par l'environnement et aussi par l'interaction entre les gènes et l'environnement. Néanmoins, pour mieux comprendre comment agissent les différents facteurs il est nécessaire de pouvoir mesurer avec précision la croissance des organismes. Dans ce contexte, notre objectif est d'utiliser une nouvelle approche dans le domaine de l'écologie évolutive pour enrichir les mesures de croissance.

Nous utiliserons une technique d'imagerie médicale, le TDM-X pour mesurer la croissance osseuse ainsi que le pourcentage de masse musculaire et de graisse au cours de la croissance. Nous travaillerons sur un oiseau communément utilisé dans les études d'écologie évolutive, le *diamant mandarin*.

Ce projet utilisera au total 46 mandarins afin de faire des tests statistiques (analyses multivariées (ACP)).

La règle des 3 R sera appliquée. Cette étude ayant pour objectif de suivre la croissance des mandarins, celle-ci ne peut s'appliquer sur une étude *in vitro*. L'utilisation de l'imagerie permet de suivre l'évolution de paramètres biologiques sur le même animal sur plusieurs jours, réduisant ainsi le nombre d'animaux. Les animaux sont hébergés à plusieurs par cage avec un enrichissement. Les animaux seront observés quotidiennement.

5586. L'optimisation de la conduite des troupeaux et la maîtrise de la robustesse des chèvres représentent un enjeu majeur pour la filière caprine tant d'un point de vue économique que sociétal. Dans ce contexte, la gestion du bien-être et de la santé des chevrettes de renouvellement dès leur plus jeune âge peut être un levier d'action pour assurer une plus grande longévité des chèvres en production et permettre ainsi de réduire le taux de réforme généralement élevé. Le projet vise à réaliser une étude en ferme expérimentale pour améliorer les conditions d'élevage des chevrettes, en cherchant notamment à évaluer l'impact de conditions d'élevage dégradées vs enrichies des chevrettes sur leur bien-être, leur santé, leur développement sexuel et leurs performances à l'âge adulte. Ce projet fournira des pistes pour développer des pratiques innovantes et assurer une maîtrise des maladies et des coûts de production en renforçant notamment les stratégies d'auto-renouvellement. L'approche expérimentale a pour but d'étudier en situation contrôlée l'impact de contraintes auxquelles les chèvres peuvent être exposées de manière répétée durant leur gestation (manipulations brusques, retard d'alimentation, mises en lots...) et les effets de l'enrichissement des conditions d'élevage précoce (contacts positifs avec l'homme, accès à des plateformes, aires de jeu, brosses...) sur le développement comportemental et sanitaire des chevrettes jusqu'à leur mise en lactation.

176 chèvres sont incluses dans ce projet (104 chèvres mises en gestation et leurs 72 filles).

Remplacement : compte tenu de l'objectif du projet (évaluer l'impact d'un stress prénatal et des conditions d'élevage chez la chèvre : espèce cible) et des niveaux d'intégration des données, le modèle animal ne peut pas être substitué par un autre type de modèle.

Réduction : le dispositif a été dimensionné (12 chevrettes par lot) pour permettre d'observer une différence statistique avec des analyses multivariées.

Raffinement : les chèvres seront hébergées en groupe, sur une litière paillée. Elles seront nourries à volonté. Le milieu sera enrichi avec des pneus suspendus régulièrement remplis de foin pour les lots élevés en condition « conventionnelle », et d'autres types d'enrichissement physiques (plateformes, brosses) seront apportés pour les lots élevés en condition « enrichies ».

Elles feront l'objet d'une surveillance journalière pendant toute la durée du protocole.

5587. La mutation du gène Lsh/Hells chez l'Homme est la cause du syndrome ICF de type 4 (Immunodeficiency, Centromeric Instability, Facial anomaly type 4), caractérisé par un déficit immunitaire associé à une instabilité chromosomique et des anomalies cranio-faciales. Les patients atteints de ce syndrome souffrent d'infections récurrentes et ne répondent pas aux vaccins. L'origine de ce déficit n'est pas connue pour le moment du fait de l'absence de modèle animal permettant de rechercher les cellules affectées par la perte de Lsh. Nous souhaitons aborder cette question en étudiant une lignée de souris mutantes pour Lsh récemment établie et non encore caractérisée. Notre étude consistera à analyser les lymphocytes et la réponse anticorps contre des vaccins de 32 animaux, comprenant des animaux portant des allèles modifiés de Lsh et des contrôles. Les études *in vitro* ne peuvent se substituer à l'étude projetée, dans la mesure où l'étude du développement lymphocytaire B et de la réponse immunitaire ne peut être abordée que par l'expérimentation *in vivo* chez les Vertébrés. La souris constitue en l'occurrence le modèle de référence pour l'étude de la réponse anticorps et de la mémoire immunitaire. Ce nombre d'animaux sera suffisant pour étudier la présence des différentes populations lymphocytaires ainsi que la réponse humorale, en tenant compte des variabilités interindividuelles naturellement observées pour ces processus. Les animaux seront élevés dans un environnement enrichi (maisonnettes en carton et/ou tubes en carton) et nous respecterons des points limites humains définis par l'aspect (ouverture des yeux, pelage) et le comportement (locomotion) des animaux subissant les différentes procédures.

5588. La SUMOylation est une modification protéique post-traductionnelle impliquée dans de nombreux processus cellulaires. L'absence de SUMOylation est létale chez la souris dès les premiers stades embryonnaires. La bibliographie et nos données *in vitro* et *in vivo* montrent que la SUMOylation est essentielle lors de la division cellulaire. Brièvement, l'inactivation conditionnelle de la SUMOylation, chez des souris adultes conduit à une dérégulation du fonctionnement de l'épithélium intestinal occasionnant la mort rapide de l'animal.

Notre projet consiste à comprendre les conséquences physiologiques d'une inactivation de la voie SUMO dans des neurones post-mitotiques. Nous allons générer des souris transgéniques présentant une absence de SUMOylation dans les neurones corticaux et hippocampaux du cerveau.

L'étude se porte sur un modèle souris car il est indispensable de comprendre le rôle de SUMO *in vivo* dans le cerveau, organe complexe et structuré. C'est pourquoi, l'ensemble de ce travail ne peut pas être réalisé sur des cellules *in vitro*. Les animaux seront surveillés tous les jours. Nous serons attentifs au comportement des souris afin d'éviter toute forme de souffrance.

Nos études permettront également de mieux comprendre le rôle de la sumoylation dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson.

Nous estimons à 1100, le nombre de souris en classe légère auxquelles nous aurons recours pour explorer et caractériser le rôle de SUMO dans l'homéostasie neuronale et cela en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

5589. Le Département du Haut-Rhin a engagé un programme de restauration écologique des cours d'eau. Ce programme doit permettre l'atteinte du bon état écologique des masses d'eau, selon les objectifs fixés par la Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE), et en particulier la restauration de la continuité écologique. La notion de continuité écologique, introduite dans la DCE, a été réaffirmée dans la loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA). Elle vise notamment à rétablir la libre circulation des organismes aquatiques et leur accès aux zones indispensables à leur reproduction, leur croissance, leur alimentation ou leur abri. Depuis plusieurs années, de nombreuses actions de restauration de la continuité ont été réalisées dans les rivières du Haut-Rhin, conduisant notamment à la construction de passes à poissons. Toutefois, il n'y a pas eu de suivi scientifique permettant d'évaluer le bénéfice de ces actions sur la faune piscicole.

Le présent projet vise à évaluer l'attractivité et la franchissabilité de 8 passes à poissons (existantes ou en cours de réalisation d'ici 2018) sur deux cours d'eau et pour différentes espèces de poissons (principalement *truite*, *saumon*, *chabot* et dans une moindre mesure *chevaine*, *barbeau*, *hotu* et *vandoise*). L'objectif connexe est de mesurer les migrations piscicoles à plus large échelle (franchissement de plusieurs ouvrages).

Le projet propose d'étudier sur une durée de 5 ans le comportement migratoire d'un échantillon de 7700 poissons sauvages marquées à l'aide de puces RFID (PIT tags) et détectés à l'aide d'antennes de détection fixes. Les passes à poissons seront équipées d'antennes de détection en amont et en aval, permettant de détecter l'entrée et la sortie d'un individu dans la passe. Une antenne supplémentaire pourra être ajoutée dans certains cas plus en aval dans le lit du cours d'eau pour évaluer l'attractivité de la passe. Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement *in natura*. L'effectif de 7700 individus marqués toutes espèces confondues (3800 truites et saumons, 1700 chabots, 1600 chevaines et vandoises, 600 barbeaux et hotus) est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population pour évaluer la variabilité interannuelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Réduction). En effet, seule une fraction minoritaire des individus va migrer, l'autre fraction est résidente et ne sera pas détectée. Les marques PIT tags seront implantées dans la cavité péritonéale. Les animaux seront anesthésiés lors de l'opération, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-opératoire assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel (Raffinement).

5590. Depuis de nombreuses années, les antibiotiques sont utilisés chez l'humain mais également chez l'animal afin de traiter des pathologies d'origine bactérienne. En production porcine, le sevrage représente une période charnière du fait du stress social induit par la séparation de la truie, du passage d'une alimentation liquide à solide et des conditions de logement nouvelles. Cette association de stress entraîne des troubles digestifs associés à des signes de diarrhée et de mortalité, généralement prévenus par des antibiotiques. Cependant, ces pratiques augmentent les risques d'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques, d'autant plus que certains sont utilisés à la fois en médecine humaine et animale, ou que les humains peuvent être exposés à ces bactéries résistantes retrouvées chez les animaux, par contact ou par ingestion d'aliments contaminés (ex. *Salmonelles*).

Il est donc indispensable de trouver des alternatives à ces antibiotiques afin de réduire la prévalence de l'antibiorésistance tout en maintenant les animaux en bonne santé. Ce projet a pour objectif d'évaluer l'efficacité de différentes stratégies nutritionnelles garantissant une bonne santé digestive, réduisant l'utilisation des antibiotiques chez le porcelet sevré tout en restant pertinentes du point de vue technico-économique. Une procédure expérimentale sera mise en place pour étudier l'influence de divers facteurs sur les performances de croissance des porcelets sevrés et leur santé digestive, notamment : la modulation de la composition, de la présentation et de la distribution des aliments alloués aux porcelets sevrés, ainsi que la mise en place de différentes techniques d'élevage, de pratiques d'administration et de conditions environnementales applicables au post-sevrage. Cette procédure comporte notamment une série de mesures favorisant la présentation de troubles digestifs chez les porcelets. Ce projet ciblera des porcelets sevrés âgés de 21 à 70j, espèce et stade physiologique cibles du projet. En effet, les spécificités d'espèce sur les mécanismes de régulation physiologiques (endocrinologiques, métaboliques), les besoins nutritionnels des animaux etc... ne permettent pas d'utiliser des modèles alternatifs (modélisation, systèmes *in vitro*...). Le projet durera 5 ans, inclura un maximum de 4320 porcelets, dont 20% seront soumis à des prélèvements biologiques et 5% pourront être sacrifiés pour des prélèvements biologiques post-mortem. Les animaux seront élevés dans des conditions représentatives des pratiques d'élevage et dans le respect des obligations réglementaires qui y sont associées (densité, enrichissement du milieu) c'est-à-dire en groupes dans des cases permettant l'accès à des chaînes manipulables associées ou non à des ballons. Une seule procédure expérimentale sera mise en place dans le projet. Pour chaque acte pouvant engendrer une souffrance ou un stress (administration orale individualisée, conditions environnementales optimales et prélèvements de sang ou de fèces), le nombre d'animaux sera réduit au minimum permettant la démonstration statistique d'un effet du traitement. D'autre part, plusieurs méthodes seront mises en œuvre afin de réduire le stress ou la souffrance appliqué à ces animaux (limite du nombre de tentatives de collectes d'échantillons biologiques, restriction de la manipulation des animaux, nombre d'animaux exposés à la procédure définie).

5591. Les eczéma allergiques tels que l'eczéma de contact (colorants, produits chimiques, nickel...) ou l'eczéma atopique (acariens, moisissures, poils de chien/chat...) se caractérisent par des lésions cutanées et sont dues à une réaction allergique. Ces eczéma touchent plus de 15% de la population. La cause de ces eczéma est complexe et reste mal comprise à ce jour. Elle serait associée à des défauts génétiques de la barrière épidermique, et/ou autres anomalies immunologiques, qui favoriseraient la

pénétration d'allergènes au sein de l'organisme, et le développement de l'allergie (sensibilisation) chez les individus. Chez ces personnes allergiques, les lésions d'eczéma sont induites par des lymphocytes qui vont cibler et éliminer les kératinocytes de la peau qui présentent l'allergène à leur surface. Ainsi, la peau est lésée et enflammée.

Il est connu que ces lymphocytes circulent à travers l'organisme dans le sang et la lymphe ou restent positionnés dans les ganglions lymphatiques prêts à être réactivés. Néanmoins, ces dernières années, une population de lymphocytes mémoires résidant dans les tissus a été mise en évidence. Ces lymphocytes ne recirculent pas dans l'organisme et patrouillent dans les épithéliums à l'interface entre l'organisme et l'environnement. Ils sont notamment essentiels pour répondre rapidement et efficacement à toute nouvelle infection virale.

Il s'agit donc à travers ce projet d'étudier la contribution des lymphocytes mémoires résidant dans la peau (TRM) à la récurrence, aux poussées et à la sévérité de l'eczéma.

Les résultats de ce projet apporteront une meilleure connaissance de la physiopathologie de l'eczéma ainsi que la caractérisation d'une nouvelle population impliquée dans la chronicité de l'eczéma. Ces données ouvriront donc la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à limiter ou à abroger la récurrence des eczémas en ciblant cette population de TRM.

Les expériences ont été conçues en accord avec la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet aucun test *in vitro* (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie. Nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 3120 souris, âgées de 5 à 7 semaines au début des protocoles. Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par lots d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu.

5592. La douleur est un véritable enjeu de santé publique, critère de qualité et d'évolution d'un système de santé : c'est un problème majeur de société. Sa prise en charge répond à un objectif humaniste, éthique et de dignité de l'homme en raison des retentissements physiques et psychiques. Elle induit un handicap qui exclut progressivement ou brutalement le patient de la société. La douleur physique et la souffrance morale ressenties à tous les âges de la vie rendent plus vulnérables les personnes fragilisées par la maladie. Les douleurs chroniques rebelles sont sources d'incapacités, de handicaps, d'invalidité et d'altérations majeures de la qualité de vie. Les progrès de la médecine ont permis la guérison de certaines maladies graves, mais aussi la transformation de maladies aiguës en maladies chroniques. Le résultat est une augmentation de l'espérance de vie pouvant être accompagnée d'une souffrance chronique. Soulager celle-ci est donc une obligation essentielle qui repose sur l'éthique médicale et l'Organisation Mondiale de la Santé a recommandé que chaque pays fasse de la politique de lutte contre la douleur une priorité.

A ce jour, la morphine reste l'opioïde fort de référence pour le traitement de la douleur. Cependant, elle n'est malheureusement pas dénuée d'effets secondaires pouvant mener à la dépression respiratoire. Il est donc essentiel de mettre au point de nouveaux outils pouvant soulager efficacement la douleur et qui ne présentent pas les effets secondaires observés avec la morphine.

Les neuropeptides sont des molécules naturelles chez l'homme, qui jouent un rôle très important dans la régulation de la douleur. Ces neuropeptides, qui agissent au niveau du système nerveux, présentent un potentiel thérapeutique considérable pour le traitement de la douleur. Cependant, ils présentent des inconvénients majeurs qui limitent leur efficacité thérapeutique. D'une part, ils présentent des difficultés à traverser la barrière sang/système nerveux pour accéder à leur cible. D'autre part, ils présentent une faible biodisponibilité due à une métabolisation (dégradation par les enzymes) rapide.

Récemment, le squalène (un lipide naturel), a été proposé pour transporter de nombreux principes actifs rapidement métabolisables et passant mal les barrières membranaires via des nanoparticules (milliardième de mètre). Ces systèmes permettent ainsi d'amener ces principes actifs avec des concentrations efficaces jusqu'à leur site d'action ce qui permet de restreindre leur déperdition vers d'autres tissus, limitant ainsi des effets secondaires toxiques.

Par conséquent, nous proposons de coupler des neuropeptides naturels avec le squalène pour donner les molécules neuropeptide-squalène. A partir de ces molécules, nous pourrions générer des nanoparticules qui permettraient de traiter efficacement et de manière naturelle la douleur, sans présenter d'effets secondaires. Afin de pouvoir vérifier cette hypothèse, nous devons tout d'abord tester l'efficacité de ces nanoparticules en utilisant 2 modèles d'étude de la douleur chez le rat. Dans un second temps, nous proposons d'évaluer la pharmacocinétique et la biodistribution de ces nanoparticules.

Les résultats de cette étude devraient ouvrir des perspectives d'application thérapeutique des nanomédicaments chez l'homme pour le traitement des lésions des nerfs périphériques.

Cette demande répond à la règle des 3R à savoir :

Remplacer : l'expérimentation animale est indispensable pour ce projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de rendre compte de la douleur. En effet, la connaissance des organismes vivants est loin d'être complète. Il est donc impossible de les reproduire exactement en utilisant des systèmes de culture cellulaire ou des modèles informatiques. De plus, *in vivo*, les neuropeptides sous leur forme nanoparticulaire ont une biodistribution dans l'organisme qui est complètement modifiée. Aujourd'hui, le rat constitue un bon modèle d'étude de la douleur car il possède une organisation nerveuse comparable à celle de l'homme.

Réduire : Des études préliminaires *in vitro* ont déjà permis le criblage des différentes nanoparticules de neuropeptide-squalène permettant ainsi de réduire de manière significative le nombre de rats utilisés lors des tests *in vivo*. Ce nombre est aussi réduit grâce à une planification statistique minutieuse de l'étude.

Raffiner : l'expérimentation sera réalisée dans des conditions de bien être contrôlées et selon les standards d'hébergement établis. De même, nous possédons une forte expérience dans la manipulation et la minimalisation des conditions de stress auxquelles sont soumis les rats. Des points limites tels que, l'observation de l'état général de l'animal (comportement, posture, état du pelage ...) seront mis en place pour éviter des conditions de souffrance.

Au final, sur 5 ans, nous estimons à 2592 rats le nombre d'animaux nécessaire pour mener à bien ce projet.

5593. Dans un futur proche, le nombre et la durée des missions spatiales habitées devraient inexorablement augmenter. En effet, les agences spatiales ont comme projet d'envoyer à plus ou moins long terme des astronautes sur la Lune, Mars ainsi que sur des astéroïdes; tandis que des compagnies privées souhaitent développer une exploitation commerciale de l'espace en proposant des services comme le tourisme spatial et les taxis de l'espace. Dans ce contexte, il est nécessaire de mieux connaître les effets de la microgravité sur la physiologie humaine. Chez l'homme, le vol spatial provoque une augmentation du stockage du fer associé à une diminution de sa concentration sérique. L'accumulation de fer dans les tissus est connue pour augmenter la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERDO) par la réaction de Fenton, ce phénomène pouvant déséquilibrer la balance redox en faveur des oxydants. D'un autre côté, la diminution du fer biodisponible peut provoquer une anémie. Cette situation pathologique a été rapportée depuis longtemps chez les astronautes, elle est caractérisée comme l'anémie du vol spatial. Ce phénomène est généralement attribué à la néocytole i.e., une lyse des jeunes hématies. Cependant, aucune preuve directe n'a pu mettre en évidence ce mécanisme qui demeure peu étudié à ce jour. Au sein de notre laboratoire, nous avons récemment démontré, chez le rongeur, que la simulation de microgravité chez le rongeur reproduisait les effets du vol spatial sur le métabolisme du fer. Plus spécifiquement, ces données suggèrent que la microgravité provoque une mobilisation du fer circulant vers la rate, entraînant ainsi une mauvaise distribution du fer similaire à celle observée au cours d'un vol spatial. Nos résultats soutiennent également que l'hepcidine serait sécrétée via l'activation de la voie STAT3/IL-6, c'est-à-dire en réponse à un état inflammatoire. En effet, la microgravité simulée a induit une augmentation de l'activation de STAT3 dans le foie et une augmentation du transcrite d'IL-6 dans le muscle. Ceci suggère une communication muscle-foie dans la régulation du métabolisme du fer au cours de la microgravité.

Dans ce contexte, l'objectif général de ce projet est de déterminer dans quelles mesures la gravité artificielle induite par centrifugation peut prévenir les altérations du métabolisme du fer associé à une exposition prolongée à la microgravité. Pour répondre à cet objectif, nous avons construit un projet avec une approche translationnelle divisée en 2 volets expérimentaux effectués chez l'homme et le rongeur. Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Déterminer chez l'homme dans quelles mesures la gravité artificielle prévient la réduction de la biodisponibilité du fer induite par la microgravité. Cet objectif sera conduit dans le cadre d'un projet mené avec une agence de recherche spatial.
- Déterminer chez le rongeur les mécanismes par lesquels la gravité artificielle peut moduler la biodisponibilité en fer, avec une attention toute particulière sur la régulation de l'hepcidine et de l'état inflammatoire (Volet 2)

Pour répondre à l'objectif du volet 2, nous utiliserons un modèle de microgravité simulée chez le rat pour mimer les effets de la microgravité observée dans l'espace. 30 rats Wistar mâles seront obtenus à l'âge de 5 semaines. Après une semaine d'acclimatation, les animaux seront répartis de manière aléatoire dans 3 groupes expérimentaux (n=8 par groupe) : un groupe contrôle (CON), un groupe microgravité et un groupe microgravité mais réexposé aux effets de la gravité 1h/jour. Le protocole de suspension se poursuivra pendant 28 jours afin d'observer les effets à long terme de la microgravité. La taille de l'échantillonnage a été définie à partir du Sample Size Test, ceux qui correspondent à un échantillonnage de n=8, ce qui correspond à un total de 30 rats. Ce protocole expérimental permettra de mettre en évidence de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires se produisant à long terme à la microgravité. De plus, ces recherches permettront également de déterminer si la gravité artificielle permet de prévenir efficacement les troubles du métabolisme du fer en situation de microgravité.

Ce projet de recherche a été pensé en respectant au mieux la règle des 3R.). Ainsi, par l'intermédiaire de ce protocole expérimental, nous pourrions déterminer de changements physiologiques au sein des tissus musculaires et hépatiques donc seulement observables dans un modèle *in vivo* (Remplacement). Le nombre d'animaux est choisi en fonction du nombre nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable pour valider les données obtenues à la fin de la procédure (Réduction). Enfin les animaux seront hébergés dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animal et assure le suivi quotidien. L'hébergement se fait dans des cages individuelles, accolées et transparentes, pour réduire la sensation d'isolement. De plus, les cages sont munies de jouets compatibles avec le modèle afin de minimiser le stress induit par le modèle expérimental. Le Raffinement est complété par une double surveillance journalière des animaux pour vérifier les meilleures conditions de bien-être possible (Raffinement).

5594. L'hypertension pulmonaire (HP) correspond à un groupe de maladies vasculaires pulmonaires rares et graves. Cette pathologie est caractérisée par un rétrécissement progressif des vaisseaux pulmonaires et se complique par un mauvais fonctionnement (insuffisance) du ventricule droit qui souffre de façon chronique d'un excès de pression. Cette insuffisance cardiaque droite conditionne la survie des patients. Une mortalité de plus de 80% à 5 ans est observée chez les patients atteints d'HP avec insuffisance cardiaque droite contre une mortalité de 40% à 5 ans chez les patients atteints d'HP sans dysfonction ventriculaire droite. Si différentes thérapeutiques de l'HP sont validées ou en cours de l'être, le seul traitement curatif est la transplantation bi-pulmonaire ou cardio-pulmonaire. D'autres traitements médicamenteux ciblant le système vasculaire pulmonaire sont utilisés mais ne permettent pas d'éviter la défaillance cardiaque droite. Il est donc de première importance de traiter l'ischémie cardiaque droite des patients HP afin de prolonger significativement leur durée de vie.

Depuis quelques années, les approches de thérapie cellulaire dans l'insuffisance cardiaque gauche ont montré une certaine efficacité. Dans ce projet, nous souhaitons développer la thérapie cellulaire pour traiter l'insuffisance cardiaque droite.

Nous utiliserons des cellules immatures, présentes dans le sang, et dont le rôle est le maintien de l'intégrité vasculaire. Ces cellules peuvent à la fois participer à la formation de nouveaux vaisseaux et à la réparation de ceux lésés.

Avant de tester cette thérapie prometteuse chez les patients, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche, le devenir des cellules implantées et l'efficacité de la thérapie cellulaire sur un modèle animal. En effet, à notre connaissance, une seule étude a travaillé sur un projet de thérapie cellulaire en *ex vivo* (tests biologiques mis en place en dehors de l'organisme). Cependant il paraît évident que ce type de modèle ne permette pas de répondre à plusieurs problématiques telles que le devenir des cellules administrées et l'effet sur le muscle cardiaque à long terme, ainsi que la faisabilité de la manipulation.

Concernant les maladies cardiovasculaires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine de par l'existence de caractéristiques anatomiques et physiologiques cardio-vasculaires comparables à celles de l'Homme.

De plus, un modèle porcin d'HP présentant un remodelage structurel et fonctionnel du ventricule droit a déjà été mis en place au laboratoire, il a été breveté et utilisé pour plusieurs études sur l'HP déjà publiées. Ce modèle animal reproduit au mieux les différentes caractéristiques de la pathologie observées chez l'Homme.

Le but de ce projet sera d'administrer les cellules au niveau du ventricule droit (VD) et d'évaluer, dans ce modèle d'HP porcins, s'il y a ou non amélioration de la maladie.

Il a été défini par analyse statistique qu'un effectif minimal de 40 porcs sera nécessaire. Le nombre d'animaux sera réduit au maximum pour atteindre une significativité statistique. Nous avons choisi de compter sur 8 animaux par groupe. Cependant, une fois le nombre de 6 animaux par groupe atteint, nous n'incluons plus d'animaux dans ce groupe.

Les méthodologies employées seront en parfait accord avec les règles d'expérimentation animale; Elles tiennent compte de la notion de point limite et définissent des critères d'interruption d'expérimentation. Les procédures proposées n'induiront que des souffrances modérées grâce au recours systématique d'une anesthésie générale et d'antalgiques dès que cela est nécessaire.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée et seront stabulés en groupe de deux dans des cages de 2m² (individus de poids <50kg) pour permettre un contact régulier entre congénères et réduire les stress. Leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, « médecine ball », jeux dans le couloir, pesée sous forme de jeux avec récompense, planche à gratter, distributeur d'aliment actif...).

5595. L'hormone thyroïdienne est essentielle dans l'organisme non seulement au cours du développement, mais aussi chez l'adulte, notamment pour le contrôle du métabolisme. Il existe deux types de récepteurs de l'hormone thyroïdienne, répartis dans tout l'organisme : TR α et TR β , codés respectivement par les gènes *Thra* et *Thrb*. Depuis plus de 20 ans, des patients humains portant des mutations de *Thrb* ont été identifiés et leur maladie, la résistance à l'hormone thyroïdienne de type β , a pu être étudiée. En revanche, les premiers patients humains portant des mutations de *Thra* n'ont été identifiés que récemment (2012), grâce à la propagation des techniques de séquençage du génome en clinique humaine. Ces patients ne présentent pas d'altération majeure des taux d'hormones thyroïdiennes dans le sang et sont caractérisés par une grande variabilité des tableaux cliniques, ce qui complique le diagnostic. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement satisfaisant pour ces patients, qui présentent fréquemment des symptômes invalidants (troubles de croissance, constipation, déficits moteurs et cognitifs). La variabilité observée en clinique pourrait être liée au fait que selon les patients, la mutation se trouve dans différentes régions du gène *Thra*. L'objectif de ce projet est d'étudier la relation entre site de mutation dans le gène *Thra* et conséquences fonctionnelles dans l'organisme chez la souris, qui est un bon modèle pour cette question car l'hormone thyroïdienne et le récepteur TR α jouent des rôles similaires chez la souris et chez l'homme.

Le projet consiste à étudier la physiologie et le comportement de souris présentant différentes mutations du gène *Thra*, dans le but de mieux comprendre le rôle des différentes régions du gène dans la fonctionnalité du récepteur. Certaines des mutations sont susceptibles d'induire un phénotype dommageable pour la souris. Une surveillance accrue des premiers animaux obtenus pour chaque lignée, ainsi que l'utilisation de points limites adaptés permettra de limiter la souffrance des animaux. A terme, les résultats obtenus devraient permettre une meilleure prise en charge des patients portant une mutation de *Thra*, non seulement sur le plan du diagnostic mais aussi sur le plan thérapeutique, en tenant compte du type de mutation qu'ils portent.

L'objectif de ce projet étant d'étudier l'impact de mutations sur la physiologie et le comportement, il est nécessaire de travailler sur un organisme entier. Des études *in vitro* sont réalisées en parallèle, notamment pour aborder les aspects moléculaires de la signalisation par TR α . Le nombre de souris indiqué est un nombre maximum, qui ne sera sans doute pas atteint. En effet, les mutations n'ayant pas de conséquence notable sur l'organisme feront l'objet d'études moins poussées et impliqueront donc moins d'animaux, que celles affectant significativement la physiologie et/ou le comportement. Les aspects moléculaires de la signalisation par TR α sont également étudiés *in vitro*, ce qui permet d'orienter le choix des mutations pertinentes à étudier *in vivo* et donc de limiter le nombre d'animaux étudiés. Compte tenu de l'aspect exploratoire de ce projet, les souris seront suivies avec un soin particulier, afin de détecter précocement tout signe éventuel de souffrance. Ce projet concernera 1980 souris au maximum.

5596. La consommation de viande rouge et de charcuteries est associée à une augmentation du risque de cancer du côlon. Les données épidémiologiques ont été consolidées par des études du laboratoire à l'aide de modèles animaux. Les mécanismes mis en jeu impliquent l'oxydation des graisses alimentaires par le fer contenu dans la viande rouge. Une des hypothèses implique la modification de la paroi du côlon par les composés toxiques issus de l'oxydation des graisses alimentaires comme le 4-hydroxynonénal, qui est un produit toxique. Le but de ce protocole est d'évaluer *in vivo* la formation de ce composé suite à une administration orale de fer héminique et de lipides insaturés. En effet, aucun modèle *in vitro* ne permet de rendre compte de la complexité du processus digestif. Notre étude portera donc sur un modèle animal de référence: le rat. Ainsi, 6 lots de 2 rats seront utilisés. Ce nombre d'animaux a été étudié de façon à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés. Les animaux seront hébergés en animalerie standard, dans les meilleures conditions pour leur assurer bien-être et maintien en bonne santé.

5597. Les cellules lymphoïdes innées sont des cellules productrices de cytokines ayant la même morphologie que les lymphocytes T ou B, mais dépourvues de récepteurs réarrangés. Ces cellules récemment découvertes jouent des rôles importants dans les réponses aux pathogènes et notamment dans les muqueuses. Cette population est hétérogène, classée en plusieurs types selon les cytokines produites. Une population, notamment, produit l'interleukine 22 (IL-22) qui agit spécifiquement sur les épithéliums. L'IL-22 contribue à la réparation des muqueuses endommagées et régule nos interactions avec le microbiote.

L'origine évolutive de ces cellules est inconnue ; à part chez l'homme, elles n'ont encore été identifiées que chez la souris. Le gène *il22* est clairement présent chez les poissons, mais on ne sait pas quelles cellules l'expriment. Ce projet vise à déterminer si des cellules lymphoïdes innées existent chez un petit poisson modèle, le *danio zébré*, si certaines produisent de l'IL-22, et si le rôle de cette cytokine est conservé dans cette espèce. Ce projet permettra de mieux comprendre l'évolution de cette population cellulaire importante, et fournir de nouveaux outils permettant de parfois remplacer les mammifères par des animaux plus simples pour étudier ces cellules, avec des approches plus raffinées, comme l'imagerie intravitale non-invasive.

Ce projet requiert l'emploi de 1941 *danios zébrés* adultes ou juvéniles et de 504 larves. Il comprend 5 procédures, une de classe de sévérité « légère » et quatre « modérée ».

Il requiert l'emploi de poissons immunodéficients, qui devraient être plus sensibles aux infections lors de leur élevage. L'étude des propriétés de ces cellules va nécessiter l'injection de préparations induisant des réponses inflammatoires fortes, mais de courte durée. Par ailleurs, afin d'évaluer la réparation des muqueuses, il sera nécessaire d'appliquer un traitement causant une inflammation digestive pendant quelques jours.

Ce projet respecte la règle des 3R, utilisant un vertébré inférieur, des nombres d'animaux choisis les plus bas possibles tout en permettant de tester les hypothèses et vérifier la répétabilité des expériences, et combinant autant que possible les méthodes d'analyses afin d'obtenir le maximum d'informations à partir des animaux utilisés.

5598. Le hyalobarrier est un gel stérile, transparent et hautement visqueux qui peut être appliqué en fin d'intervention chirurgicale abdominale sur les zones opérées. En effet, une des problématiques de la chirurgie abdominale est la formation d'adhérences entre les organes pouvant engendrer des conséquences comme des douleurs chroniques ou des troubles de la fertilité. Par ailleurs, ces adhérences peuvent rendre difficile l'abord de la cavité péritonéale (abdominale) lors d'une prochaine intervention.

Grâce à sa viscosité, le Hyalobarrier se fixe à la surface du tissu et à la paroi abdominale, créant une barrière anti-adhérentielle qui maintient les tissus adjacents séparés pendant la phase de guérison post-opératoire.

A ce jour, le hyalobarrier a démontré son efficacité comme barrière anti-adhérentielle pour des petites zones de dissection. Cependant, lorsque des dissections chirurgicales étendues sont nécessaires, il devient impossible d'étaler le gel dans toute la cavité péritonéale. Par exemple, dans le cas d'une chirurgie pour cancer de l'ovaire, des larges dissections sont faites dans l'ensemble de la cavité abdominale, des coupes diaphragmatiques au pelvis. Or, ces patientes sont à haut risque de ré-intervention chirurgicale dans le cadre de leur maladie. Il serait donc intéressant de trouver une barrière anti-adhérentielle efficace pour ces patientes.

Depuis quelques années, une technique appelée Chimiothérapie Intra Péritonéale Pressurisée en Aérosol (ou PIPAC) est développée en Allemagne, dans le cadre du cancer de l'ovaire ou cancer digestif. Dans ce contexte, elle consiste à nébuliser la chimiothérapie dans la cavité péritonéale sous anesthésie générale via un orifice de 1 cm dans la paroi abdominale, par cœlioscopie. L'avantage de cette technique est l'application homogène sur l'ensemble du tissu péritonéal recouvrant la cavité abdominale.

Cette technique pourrait permettre de nébuliser d'autres substances que des anticancéreux dans l'abdomen, comme par exemple une substance anti-adhérentielle : le hyalobarrier.

L'objectif de notre étude est le développement d'un modèle de scarification péritonéale chez la brebis et l'évaluation de l'administration de hyalobarrier® par PIPAC sur les adhérences post-opératoires.

Le Hyalobarrier® est un gel formant une barrière entre les tissus adjacents permettant de diminuer les accolements appelés adhérences. Les adhérences post-opératoires sont pourvoyeuses de douleurs chroniques, infertilité, difficultés opératoires si nécessité de nouvelle chirurgie. Il est habituellement simplement déposé sur les zones opérées de manière localisée. L'objectif de ce protocole sera de démontrer que le pouvoir anti-adhérentiel du Hyalobarrier® est plus important lorsqu'on l'administre par PIPAC. Pour tester l'administration intra-péritonéale de Hyalobarrier® par PIPAC, nous allons créer un modèle animal de scarification péritonéale.

La scarification péritonéale consiste en la réalisation d'une plaie du péritoine de manière standardisée concernant la taille et la localisation dans l'abdomen. Elle est faite sous anesthésie générale, par cœlioscopie (intervention chirurgicale nécessitant seulement 4 incisions de 5 à 10mm). La création de ce modèle animal permettra de comparer la qualité de cicatrisation selon le traitement administré. Le médicament sera administré selon différents protocoles dans le même temps que la scarification péritonéale. L'état de la cicatrice sera évalué après euthanasie de la brebis, 14 jours après la scarification par description de l'aspect visuel de la cicatrice et réalisation de prélèvements permettant une analyse microscopique du tissu péritonéal.

Pour notre étude, la brebis est l'animal de choix. Il ne peut être remplacé par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, l'anatomie intra-abdominale de la brebis se rapproche de celle de la femme. De plus, un animal de grande taille est nécessaire pour la mise en place du dispositif nécessaire à la réalisation de la PIPAC.

Pour ce protocole, 9 brebis seront utilisées : 3 groupes de 3 brebis seront formés. Le premier groupe n'aura pas de traitement, le deuxième groupe aura une administration hyalobarrier® par application simple, le 3ème groupe aura une application de hyalobarrier® par PIPAC. Les brebis seront hébergées en condition conventionnelle (bergerie), en groupe. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables sur la base d'études sur un modèle de scarification existant chez le lapin.

Les 9 brebis seront euthanasiées à J14 de la procédure par injection létale de doléthal. Les adhérences seront décrites et classées et une analyse microscopique de la cicatrisation sera faite.

Toutes les dispositions seront prises pour limiter au maximum la douleur de l'animal avec l'administration d'analgésiques (butorphanol). La cœlioscopie est une intervention chirurgicale peu invasive donc peu douloureuse dans la période post-opératoire. Les protocoles d'anesthésie et analgésiques ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Notre étude permettra de créer un modèle de PIPAC chez le grand animal qui offrira par la suite la possibilité de tester un nombre important de médicaments par PIPAC, qu'il s'agisse de traitements anti-cancéreux ou d'autres classes de médicaments.

Elle pourra permettre si notre hypothèse était confirmée, de développer une nouvelle stratégie préventive contre les adhérences post-opératoires, notamment pour les patientes opérées pour cancer de l'ovaire.

5599. En France, le cannabis est l'une des substances psychoactives les plus consommées après l'alcool, le tabac et les médicaments psychotropes. La consommation de cannabis est préoccupante chez les jeunes notamment pendant l'adolescence qui représente une période toute particulière de vulnérabilité. Plusieurs études épidémiologiques montrent que le cannabis n'aurait pas l'innocuité initialement pensée, notamment en cas de consommation chronique, importante et précoce mais constituerait un terrain de vulnérabilité pour le développement de maladies psychiatriques et plus particulièrement la schizophrénie. Ainsi, certaines études récentes de cohortes ont montré que la consommation de cannabis s'associe à un risque accru de développer ultérieurement une schizophrénie de façon « dose-dépendante », risque plus marqué dans le cas d'une consommation précoce (avant 15 ans).

Par ailleurs, l'hypothèse étiopathogénique la mieux documentée est l'hypothèse neurodéveloppementale suggérant que la schizophrénie est l'expression retardée d'anomalies cérébrales précocement acquises. Ainsi, il a été suggéré que le cannabis pourrait agir en tant que facteur de décompensation d'une vulnérabilité qui aurait pour support une anomalie neurodéveloppementale.

Ces observations soulèvent des questions scientifiques qu'il convient de résoudre afin de déterminer précisément les risques associés à la consommation de cannabis à l'adolescence.

Dans cette optique, la modélisation chez l'animal est un outil majeur.

Aussi, *via* l'utilisation d'un modèle d'administration chronique chez le Rat, nous étudierons les conséquences à l'âge adulte d'une exposition chronique aux cannabinoïdes pendant l'adolescence chez des animaux ayant été exposés à un stress prénatal. Nous étudierons l'apparition d'éventuels traits comportementaux en rapport avec la « cognition », la « dépression », l'« anxiété », ou la « psychose » et qui pourraient s'apparenter aux symptômes de pathologies psychiatriques. Les conséquences fonctionnelles et les altérations cellulaires et anatomiques seront également explorées à l'aide de techniques de biochimie et d'immunohistochimie.

Pour ces expériences un total de 1152 rats sera utilisé. Un tel nombre est nécessaire afin de disposer d'effectifs suffisants pour permettre des comparaisons statistiques cohérentes dans chacune des procédures expérimentales utilisées. Nos expériences ont été conçues de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser. Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur.

5600. Chaque année, 4600 cancers de l'ovaire sont diagnostiqués. Ce cancer présente un pronostic sombre avec une espérance de vie à quelques mois notamment en cas de récurrence. La propagation de ce cancer est principalement intra-abdominale, avec présence de nodules tumoraux sur le tissu protégeant les organes de l'abdomen, appelé péritoine. Dans la majorité des cas, le cancer de l'ovaire est diagnostiqué lorsque la tumeur s'est déjà propagée sur le péritoine : carcinose péritonéale. Le traitement de référence associe une chirurgie et une chimiothérapie. Cependant, la plupart des patientes récidivent. Hors, l'efficacité de la chimiothérapie diminue en cas de récurrence et la chirurgie n'est pas réalisable. Les possibilités de traitement deviennent très minces. La maladie cancéreuse ovarienne étant souvent confinée à la cavité abdominale, elle est la cible idéale pour l'administration intra-abdominale de chimiothérapie. Depuis quelques années, une technique appelée Chimiothérapie Intra Péritonéale Pressurisée en Aérosol (ou PIPAC) est développée en Allemagne. Elle consiste à nébuliser de la chimiothérapie directement sur les nodules tumoraux dans l'abdomen sous anesthésie générale via un orifice de 1 cm dans la paroi abdominale, par cœlioscopie.

Le PIPAC est une technique qui n'existe pas en France à ce jour. Elle est innovante et prometteuse dans le domaine du cancer de l'ovaire. Les avantages de cette technique pour les patientes en récurrence seraient une plus grande efficacité de la chimiothérapie par application directe sur les nodules avec une tolérance meilleure au traitement puisque le médicament ne passe pas par le sang. Pendant une cœlioscopie, l'abdomen est amplifié par l'insufflation intra-péritonéale de CO₂. La pression intra-abdominale et le débit du CO₂ sont réglés par l'opérateur et sont ainsi maintenus pendant toute la durée d'intervention. Pendant une procédure de PIPAC, la pression est réglée à 12mmHg.

L'objectif de notre étude est de démontrer que l'augmentation de la pression intra-abdominale permet une pénétration plus importante de la chimiothérapie dans le péritoine chez la brebis.

Pour cela, nous utiliserons la doxorubicine. Il s'agit d'une chimiothérapie habituellement administrée par voie sanguine dans de nombreux cancers. Son mode d'action est de s'intercaler entre les 2 brins d'ADN de la cellule tumorale empêchant ainsi la multiplication cellulaire.

En Allemagne, ce médicament est celui utilisé en routine par PIPAC.

Pour notre étude, la brebis est l'animal de choix. Il ne peut être remplacé par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, l'anatomie intra-abdominale de la brebis se rapproche de celle de la femme. De plus, un animal de grande taille est nécessaire pour la mise en place du dispositif nécessaire à la réalisation de la PIPAC.

Dans notre étude, 4 groupes de 4 brebis seront formées. Toutes auront une administration de doxorubicine par PIPAC. Les 4 groupes auront une cœlioscopie avec une pression différente : 12mmHg (standard), 15mmHg, 18mmHg, 20mmHg. Les brebis seront euthanasiées en fin d'intervention par injection de dolethal 30 minutes à 1H après la fin de la procédure. Des prélèvements multiples péritonéaux et d'organes seront après l'euthanasie.

La mesure de la pénétration tumorale dans le péritoine sera faite en microscopie avec repérage de la molécule par fluorescence. En effet, la doxorubicine a des propriétés fluorescentes.

Toutes les dispositions seront prises pour limiter au maximum la douleur de l'animal avec l'administration d'analgésique (butorphanol). La cœlioscopie est une intervention chirurgicale peu invasive donc peu douloureuse dans la période post-opératoire. Les protocoles d'anesthésie et analgésiques ont été définis et validés par une équipe vétérinaire.

Notre travail pourrait permettre, si notre hypothèse était confirmée, d'augmenter l'efficacité d'une nouvelle stratégie thérapeutique dans le cancer de l'ovaire.